
Identifizierung und Charakterisierung der mitochondrialen Translokationspore Tim23.2 als Calmodulin-bindendes Protein

Geraldine Hromatke



München 2015

Identifizierung und Charakterisierung der mitochondrialen Translokationspore Tim23.2 als Calmodulin-bindendes Protein

Geraldine Hromatke

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig–Maximilians–Universität
München

vorgelegt von
Geraldine Hromatke

München, den 17.06.2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Erklärung

Diese Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt. Ich habe nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 17.06.2015

Geraldine Hromatke

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
Abstract	xii
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1. Einleitung	1
1.1. Proteinimport in Mitochondrien	1
1.2. Kalziumregulation in Pflanzen	5
1.3. Die PRAT Gen Familie	7
Ziel der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Material	10
2.1.1. Chemikalien	10
2.1.2. Enzyme und Kits	10
2.1.3. Bakterien- und Hefestämme	11
2.1.4. Verwendete Vektoren	11
2.1.5. Verwendete Konstrukte	12
2.1.6. Größenmarker und Säulenmaterial	14
2.2. Methoden	15
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden	15
2.2.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.1.3. Klonierungsstrategien	15
2.2.2. Biochemische Methoden	16
2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Färbemethoden	16
2.2.2.2. Affinitätschromatographien	17
2.2.2.3. Quervernetzungsversuch	18
2.2.3. Zellbiologische Methoden	19
2.2.3.1. Heterologe Expression von rekombinanten Protein	19
2.2.3.2. Analyse der Topologie von atTim23.2 durch saGFP System	19

2.2.4.	Split Ubiquitin System	20
2.2.4.1.	Nährmedien und Lagerung von Hefezellen	20
2.2.4.2.	Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen	21
2.2.4.3.	Klonierungsstrategien	22
2.2.4.4.	Split-Ubiquitin-Assay	22
2.2.4.5.	β -Galaktosidase Filter Lift Assay	23
2.2.5.	Fluoreszenzmikroskopie	23
2.2.6.	Bioinformatische Methoden	24
2.2.6.1.	Erstellung von Sequenz-Alignments	24
2.2.6.2.	Berechnung der prozentualen Ähnlichkeit von atTim23.1, atTim23.2 und atTim23.3	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Kalziumregulation von atTim23.2	27
3.1.1.	<i>In silico</i> Analysen der atTim23.2 Gensequenz	27
3.1.2.	Expression und Aufreinigung von atTim23.2	29
3.1.3.	Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose	31
3.1.4.	Identifizierung der Calmodulin-Bindedomänen	34
3.1.5.	Quervernetzung von Tim23.2 (1-70), Tim23.2 (80-110) und Tim23.2 (120-140) mit EDC	38
3.1.6.	Lokalisierung von CML30	41
3.1.7.	Phylogenetische Untersuchungen der Calmodulin-Bindedomäne von atTim23.2	44
3.2.	Untersuchung der Dimerisierung von atTim23.2 mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems	48
3.2.1.	Das Split-Ubiquitin-System	48
3.2.2.	Konstruktion des Bait-Vectors	49
3.2.3.	Dimerisierung von atTim23.2	53
3.2.4.	Identifizierung der Interaktionsdomäne von atTim23.2	56
3.3.	Topologie von atTim23.2	59
3.3.1.	Topologievorhersagen für atTim23.2	59
3.3.2.	Untersuchungen der Topologie von atTim23.2 mit dem saGFP-System	60
4.	Diskussion	67
A.	Anhang	82
	Danksagung	84
	Lebenslauf	86

Abbildungsverzeichnis

1.1. Überblick des Proteinimports in Mitochondrien	3
3.1. Analyse potentieller CaMBDs in der Aminosäuresequenz von atTim23.2	28
3.2. Helical wheel Darstellung der CaMBDs von atTim23.2	29
3.3. Aufreinigung von atTim23.2 über Amylose- und Streptavidin-Sepharose	31
3.4. Pull-down Assay von pMal-atTim23.2-strep und pMal-atTim17.2-strep an Calmodulin-Agarose	33
3.5. Aufreinigung der verkürzten pMal-atTim23.2-strep Konstrukte an Streptavidin-Agar	35
3.6. Pull-Down Assay von atTim23.2 (1-70), atTim23.2 (80-110) und atTim23.2 (120-140) an Calmodulin Agarose	37
3.7. Quervernetzung von atTim23.2 (1-70), atTim23.2 (80-110) und atTim23.2 (120-140) mit Calmodulin	39
3.8. Größenausschlusschromatographie von pMal-atTim23.2-strep und den verkürzten Konstrukten pMal-atTim23.2 (1-70)-strep, pMal-atTim23.2 (80-110)-strep und pMal-atTim23.2 (120-140)-strep mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule . . .	41
3.9. Graphische Darstellung der im saGFP System verwendeten Fusionsproteine . .	43
3.10. Lokalisierung von CML30 in <i>N.benthamiana</i> Protoplasten	44
3.11. Sequenzalignment potentieller CaMBDs von Tim23.1, Tim23.2 und Tim23.3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.12. Analyse der CaMBD von atTim23.1	46
3.13. Sequenzalignment potentieller CaMBDs von Tim23 aus <i>A.thaliana</i> mit pflanzlichen Organismen	47
3.14. Sequenzalignment potentieller CaMBDs von Tim23 aus <i>A.thaliana</i> mit nicht-pflanzlichen Organismen	48
3.15. Das Split-Ubiquitin System	49
3.16. Graphische Darstellung der pBT3-atTim23.2-N, pBT3-atTim23.2-C und pBT3-atTim23.2-SUC bait-Konstrukte.	50
3.17. Wachstum der transformierten Hefe auf Selektionsplatten im Kontrollassay . .	52
3.18. Graphische Darstellung der pPR3-atTim23.2-N, pPR3-atTim23.2-C und pPR3-atTim23.2-SUC prey-Konstrukte.	53
3.19. Dimerisierung von atTim23.2	55
3.20. Sequenzalignment von atTim23.2 mit scTim23	56

3.21. Identifizierung der Interaktionsdomäne von atTim23.2 mittels verschiedener prey-Konstrukte	58
3.22. Model der Topologie von atTim23.2 nach ARAMEMNON (1) und (Murcha et al. 2003) (2)	60
3.23. Graphische Darstellung der Markerproteine Mia40, OGD E1 und CAM4 für das saGFP-System	61
3.24. Fluoreszenzanalyse von <i>N.benthamiana</i> Protoplasten die Fusionsproteine von saGFP 1-10C und 11C von Mia40, OGD E1 und CAM4 ko-exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker [®] gefärbt wurden.	63
3.25. Fluoreszenzanalyse von <i>N.benthamiana</i> Protoplasten die Fusionsproteine von saGFP 1-10C und 11C sowie saGFP 11N von atTim23.2 ko-exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker [®] gefärbt wurden.	64
3.26. Fluoreszenzanalyse von <i>N.benthamiana</i> Protoplasten die Fusionsproteine von saGFP ₁₋₁₀ und saGFP ₁₁ von Mia40, OGD E1 und CAM4 und von atTim23.2 ko-exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker [®] gefärbt wurden. . .	66
4.1. Darstellung der Aminosäuresequenz von atTim23.2 mit den GxxxG-Motiven innerhalb der TMDs	71

Tabellenverzeichnis

2.1. Übersicht der in dieser Arbeit speziell erworbenen Chemikalien	10
2.2. Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Kits	10
2.3. Überblick der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme	11
2.4. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren	11
2.5. Liste der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte	12
2.6. Zusammensetzung des Dropout-Mix	21
2.7. Folgende Programme wurde für die bioinformatischen Analysen verwendet	24
2.8. Liste der Aminosäuresequenzen, die für die bioinformatischen Analyse verwendet wurden.	24
A.1. Liste der verwendeten Primer Bei den Klonierungsprimern ist die angehängte Schnittstelle angegeben. VL: Volllängenkonstrukt; fw: Vorwärtsprimer; rw: Rückwärtsprimer; AS: Aminosäure	82

Zusammenfassung

Um auf Veränderungen der Umwelt reagieren zu können, haben Pflanzen ein ausgefeiltes Signalnetzwerk in ihren Zellen entwickelt, das Reize wie Licht, abiotischen und biotischen Stress oder Hormone, in zelluläre Signale umwandelt. Durch den Einstrom des sekundären Botenstoffes Kalzium aus dem Apoplasten oder internen Speichern in das Zytosol, entsteht eine Änderung der Ca^{2+} -Ionen Konzentration. Diese wird in den Pflanzen durch spezifische Sensoren vor allem aber durch Calmodulin wahrgenommen. Kalziumsignale treten nicht nur im Zytosol auf, da neueste Untersuchungen diese ebenso im Kern, in den Chloroplasten, in den Mitochondrien und in den Peroxisomen detektieren konnten (Bachs et al. 1992, Chigri et al. 2005, Kuhn et al. 2009, Dolze et al. 2013). Der Import von Kern-kodierten Proteinen in Mitochondrien ist durch Kalzium und Calmodulin auf Höhe des TIM23- und TIM22-Komplexes reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte atTim23.2, die porenbildende Komponente des TIM23-Komplexes, als Calmodulin-bindendes Protein identifiziert werden. Pull-down-Assay an Calmodulin-Agarose konnte nachweisen, dass diese Bindung spezifisch und Kalzium-abhängig stattfindet.

Interessanterweise konnten *in silico* Untersuchungen zwei potentielle Calmodulin-Bindedomänen (CaMBD) aufzeigen. Topologie-Untersuchungen von atTim23.2 konnte zeigen, dass die im N-terminalen Bereich detektierte CaMBD im Intermembranraum (IMR) und die innerhalb der ersten LOOP identifizierte Bindestelle in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert ist. Außerdem zeigte sich eine Topologie des Proteins von vier Transmembrandomänen. Das erst kürzlich in den Mitochondrien detektierte Calmodulin-ähnliches Protein, CML30, schien ein potentiellen Interaktionspartner für atTim23.2 darzustellen. CML30 konnte im IMR der Mitochondrien detektiert werden, jedoch war es bisher nicht möglich eine Interaktion der beiden Proteine eindeutig zu zeigen. Eine weitere Eigenschaft von atTim23.2, nämlich die Fähigkeit ein Dimer zu bilden, konnte mit Hilfe des Split-Ubiquitin-System festgestellt werden. Einer Regulation zum Öffnen und Schließen der Importpore, wie es in *S.cerevisiae* gezeigt wurde, könnte demnach möglich sein. Ob ein Zusammenhang der beiden Eigenschaften von atTim23.2, Calmodulin zu binden sowie zu dimerisieren besteht, konnte bisher nicht bestätigt werden. Eine Regulation der Pore über das Kalzium/Calmodulin Netzwerk der Zelle könnte jedoch den Importprozess von Matrixproteinen mit der Stressregulation der Zelle verknüpfen.

Abstract

In order to react to changes within their environment, plants developed a specific signaling network that enables the cells to convert external stimuli including light, abiotic and biotic stress as well as hormones into cellular signals. One example is the influx of calcium, a second messenger stored in apoplasts or internal reservoirs, into the cytosol. This causes changes in the calcium-ion-concentration within the cell that are recognized by specific sensors including Calmodulin and lead to the induction of a cellular signal response. Calcium signals do not only occur in the cytosol, but also appear within the nucleus, chloroplasts, mitochondria as well as peroxisoms (Bachs et al. 1992, Chigri et al. 2005, Kuhn et al. 2009, Dolze et al. 2013). The import of nuclear encoded proteins into the mitochondria is regulated by calcium and Calmodulin at the level of the TIM23- and TIM22-complex. This study identified atTim23.2, the pore-forming component of the TIM23-complex, as a Calmodulin-binding protein. Pull-down-assays using Calmodulin-agarose revealed a specific and calcium-dependent binding. Furthermore, *in silico* analysis identified two potential Calmodulin-binding domains (CaMBD). Topology studies of atTim23.2 demonstrated that the proposed N-terminal CaMBD is located within the intermembrane space, the binding region within the first loops is located in the matrix of the mitochondria. Moreover, a topology of four transmembran domains of the protein could be shown. The recently in the mitochondria identified Calmodulin-like protein CML30 appeared to be a potential binding partner for atTim23.2. CML30 could be indeed detected in the intermembrane space of the mitochondria, but a direct interaction of the two proteins could not have been detected so far. Furthermore, using the split-ubiquitin system proved the ability of atTim23.2 to dimerize which might be responsible for the regulation of opening and closing of the importpore as it was already shown in *S.cerevisiae*. However, a correlation between the two functions of atTim23.2 to bind Calmodulin as well as to dimerize could not have been confirmed, yet. Nevertheless, the regulation of the pore via the calcium/Calmodulin signaling network could connect the import process of matrix proteins with the stress regulation of the cell.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
Bait	Köderprotein
CaMBD	Calmodulin-Bindungsdomäne
CBL	Calcineurin B-ähnliche Proteine
CDPK	Kalzium-abhängige Proteinkinase
CML	Calmodulin-ähnliches Protein
Cub	C-terminale Hälfte des Ubiquitin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
saGFP	selbst assemblierend
IM	Innere Membran der Mitochondrien (inner membrane)
IMR	I nter m embran r aum der Mitochondrien (intermembrane space)
MIA	M itochondrial I ntermembrane-Space A ssembly M achinery
MBP	Maltose bindendes Protein
Nub	N-terminale Hälfte des Ubiquitin
Oxa	O xidase A ssembly
OM	Außenmembran der Mitochondrien (outer membrane)
PAM	P resequenz T ranslocase-Associated M otor
PRAT	P räprotein und A minosäure T ransporter
Prey	Beuteprotein
SAM	Sorting and Assembly M achinery
SUB	S hort U nder B lue L ight
SUL	SUB-ähnliche Proteine
TIM	Translokationskomplex der inneren Mitochondrienmembran
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TMD	Transmembrandomäne
TOM	Translokationskomplex der äußeren Mitochondrienmembran
Tom	Protein des TOM-Komplexes
VL	Volllanges Protein

1. Einleitung

Pflanzen zeichnen sich auf zellulärer Ebene durch eine Zellwand, Vakuolen und das Vorhandensein von Chloroplasten aus. In der Endosymbiontentheorie wird die Entwicklung der pflanzlichen Zellen durch zwei aufeinanderfolgende Ereignisse beschrieben. Vor mehr als zwei Milliarden Jahren führte die endosymbiotische Aufnahme eines aeroben α -Proteobakteriums, das die Fähigkeit der Respiration bereits entwickelt hatte, in eine heterotrophe Wirtszelle zur Entstehung der ersten eukaryotischen Zellen mit Mitochondrien. Im zweiten Schritt wurde ein zur Photosynthese befähigtes Cyanobakterium in die eukaryotische Zelle aufgenommen. Hieraus entwickelten sich die heutigen Chloroplasten und später alle pflanzlichen Zellen (Mereschkowski 1905, Margulis 1970). Durch Etablierung des Endosymbionten in der Wirtszelle ging der größte Teil ihres Erbguts durch Gentransfer in das Kern-Genom der Wirtszelle verloren (Lang et al. 1999). Die meisten chloroplastidären sowie mitochondrialen Proteine müssen demnach als Vorstufenproteine im Zytosol synthetisiert und post-translational in das Organell importiert werden. Der Proteinimport ist deshalb ein wichtiger Prozess um die Funktionalität der Organellen zu gewährleisten.

1.1. Proteinimport in Mitochondrien

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgebene Organellen, welche eine essentielle Rolle während des Metabolismus, der Energieproduktion und der Biosynthese einer Vielzahl von Komponenten aus fast allen eukaryotischen Zellen spielen (Murcha et al. 2014b). Nach heutigem Stand des Wissens befinden sich geschätzte 2000 Proteine in Mitochondrien von Pflanzen. Obwohl sie ein eigenes Genom besitzen, wird lediglich ein geringer Teil der Proteine im Mitochondrium selbst synthetisiert. Der Großteil wird im Kern kodiert und muss nach Synthese im Zytosol in das Organell eingebracht werden (Lister et al. 2005). Der Transport von Vorstufenproteinen, die Sortierung in das entsprechende Subkompartiment und die korrekte Assemblierung in die endgültigen Proteinkomplexe bedarf das Zusammenspiel diverser Translokasen des Importapparates. Ferner ist das Vorhandensein eines Importsignals eine wichtige Voraussetzung für die Translokation eines Proteins in Mitochondrien, welches die spezifische Erkennung mitochondrialer Proteine ermöglicht. Vorstufenproteine mit einer N-terminalen abspaltbaren Präsequenz werden vorzugsweise in die Matrix oder zur inneren Membran transportiert. Diese Sequenzen umfassen ca. 20-50 Aminosäuren und bilden positiv geladene amphipatische α -Helixes (Schatz 1996). Eine zweite Klasse von Vorstufenproteinen besitzt keine Präsequenz, jedoch interne Zielsequenzen. Solche Proteine sind integrale Proteine der äußeren Membran, kleine Proteine des

Intermembranraumes (IMR) oder gehören zur Klasse der Carrier-Proteine der inneren Membran.

Der Übergang durch die äußere Membran wird durch den TOM-Komplex („**T**ranslocon of the **O**uter **M**embrane“) vermittelt. In Hefe setzt sich dieser aus mehreren Untereinheiten zusammen; die porenbildende Komponente Tom40, die Rezeptorkomponenten Tom70, Tom22 und Tom20, sowie den kleinen Tom-Proteinen Tom5, Tom6 und Tom7 (Murcha et al. 2014a). Vorstufenproteine werden über die Importsignale durch die spezifischen Rezeptoren erkannt und über die Pore Tom40 in den IMR transloziert. Von dort aus können β -barrel Proteine der äußeren Membran, wie Tom40 selbst, zum SAM-Komplex (**S**orting and **A**ssembly **M**achinery) transportiert und dort in die äußere Membran inseriert werden. Der MIA-Importweg (**M**itochondrial **I**ntermembrane-**S**pace **A**ssembly **M**achinery) vermittelt des Weiteren den Import von Cystein-reichen Proteinen mit einem doppelten CX₉C oder CX₃C Motiv im IMR der Mitochondrien. Im IMR befinden sich außerdem die kleinen Tim-Proteine (Tim9:10; Tim13:8), welche an der Proteinsortierung für den Carrier-Importweg und zum SAM-Komplex beteiligt sind. Zwei weitere Translokasen (TIM „**T**ranslocon of the **I**nnner **M**embrane“), der TIM23:17 Komplex und der TIM22 Komplex, sind in der inneren Membran der Mitochondrien zu finden. Über den TIM22-Komplex werden Carrier-Proteine mit interner Signalsequenz in die innere Membran transloziert. Der Import und die Insertion sind von einem Membranpotential ($\Delta\psi$) in Form eines pH-Gradienten abhängig. Der TIM23:17 Komplex ist für den Import von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz über den sogenannten allgemeinen Importweg verantwortlich (Carrie et al. 2010) und setzt sich aus den Hauptkomponenten den Transmembranproteinen Tim17 und Tim23 zusammen. TIM23-SORT, ist neben Tim17 und Tim23 außerdem mit Tim50 und Tim21 assoziiert und vermittelt die Insertion der Vorstufenproteine in die innere Membran. Dieser Prozess ist abhängig vom Membranpotential ($\Delta\psi$) über die innere Membran der Mitochondrien. TIM23-MOTOR bzw. der ATP-abhängige Import-Motor PAM (**P**resequenz **T**ranslocase-**A**ssociated **M**otor) beinhaltet weitere Komponenten (Tim44; Pam 16, 17 und 18; Mgr2; Hsp70 und Mge1), und vermittelt den Transfer der Vorstufenproteine durch den Protein-Komplex in die Matrix. Des Weiteren vermittelt der TIM23:17 Komplex den STOP-Transferweg (Pudelski B. and K. 2010). Die Vorstufenproteine tragen hier ein hydrophobes Sortierungssignal und eine Transmembrandomäne. Die laterale Sortierung in die innere Membran wird allein über das Membranpotential oder durch den vom Membranpotential-unabhängigen Transport mit der Hilfe des Superkomplexes (III/IV) der Atmungskette vermittelt. Nach dem Austritt von Vorstufenproteine in die Matrix werden diese durch Chaperone stabilisiert und die Präsequenzen vorrangig durch die Prozessierungspeptidase MPP entfernt (Gakh et al. 2002). Die Oxa-Translokase (**O**xidase **A**ssembly) ist eine evolutionär konservierte Invertase in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien. In der inneren Mitochondrienmembran ist sie an der Insertion mitochondrial kodierten Untereinheiten beteiligt, wird allerdings nicht als Komponente des mitochondrialen Importapparates angesehen (Wiedemann et al. 2004).

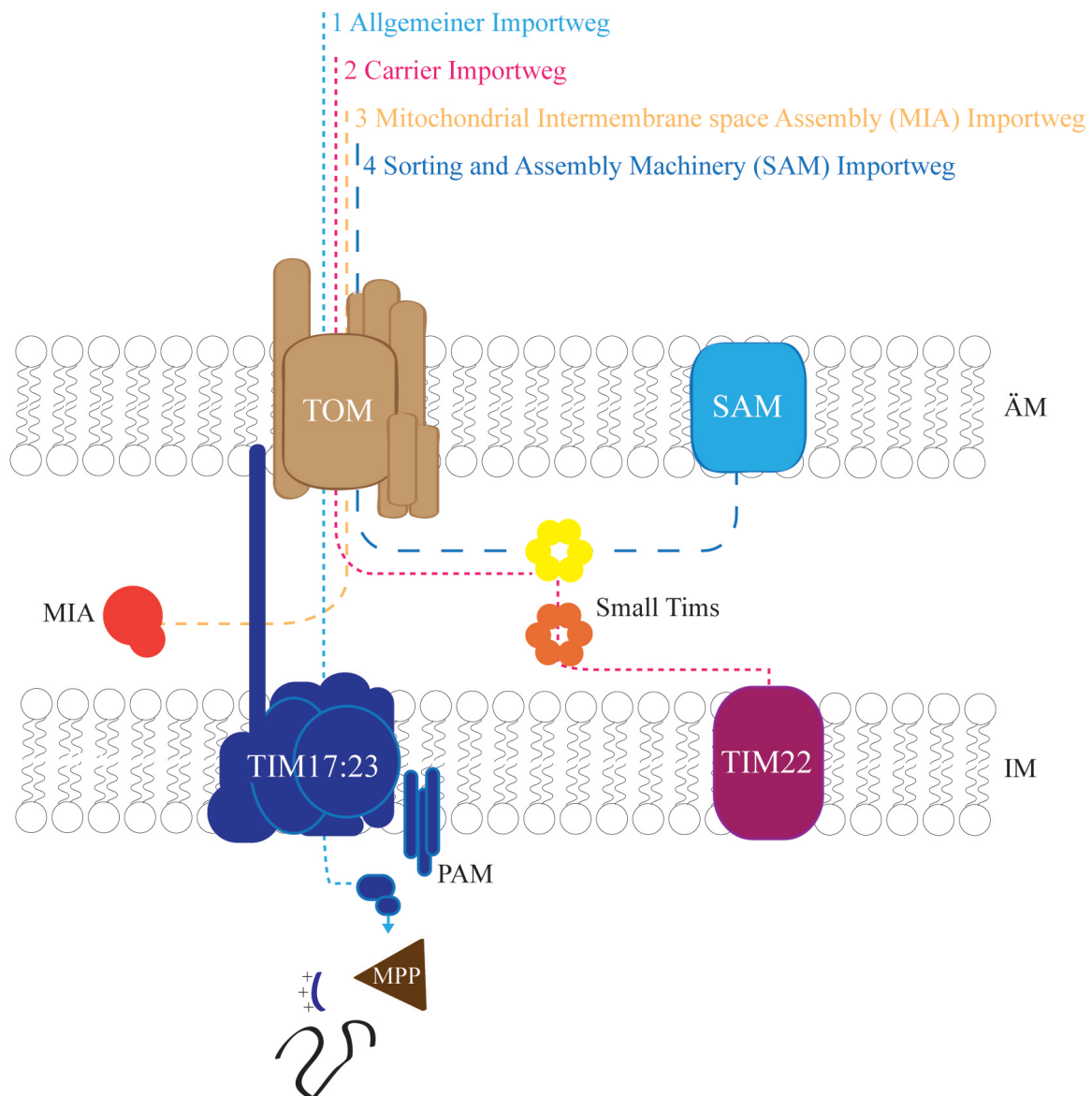


Abb. 1.1. Überblick des Proteinimports in Mitochondrien

(1) Der Allgemeine Importweg beschreibt den Import von Proteinen mit N-terminaler Signalsequenz. Nachdem Vorstufenproteine über die Translokase der äußeren Membran (TOM) in den IMR gelangt sind, werden diese mittels der Translokase der inneren Membran TIM17:23 und dem PAM-Komplex in die Matrix transloziert. (2) Proteine der inneren Membran mit interner Signalsequenz werden über den Carrier-Importweg transportiert. Nach dem Durchtritt der äußeren Membran (TOM) und der Proteinsortierung durch die kleinen Tim-Proteine im IMR, gelangen diese zum TIM22-Komplex und werden dort in die innere Membran eingebaut. (3) Der MIA-Importweg vermittelt den Import von Cystein-reichen Proteinen mit interner Signalsequenz im IMR der Mitochondrien. (4) Über den SAM-Komplex werden β -barrel Proteine in die äußere Membran der Mitochondrien eingebaut. Nach Translokation über den TOM-Komplex werden β -barrel Proteine mit interner Signalsequenz über die kleinen Tim-Proteine im IMR zum SAM-Komplex transloziert und dort in die äußere Membran eingebaut. Die Oxa-Translokase ist an der Insertion mitochondrial kodierter Untereinheiten in die innere Membran beteiligt. TOM: Translocon of the Outer Membrane; TIM: Translocon of the Inner Membrane; MIA: Mitochondrial Intermembrane space Assembly; SAM: Sorting and Assembly Machinery; PAM: Presequenz Translocase-Associated Motor; MPP: Prozessierungspeptidase; ÄM: Äußere Membran; IM: Innere Membran.

Das Grundgerüst des mitochondrialen Importapparates wurde bereits in den frühen eukaryotischen Organismen gebildet. Eine Vielzahl von Komponenten, welche einen spezifischen und effizienten Transport mitochondrialer Proteine von Ihrem Syntheseort im Zytosol bis zur ihrer endgültigen Lokalisierung im Organell ermöglichen, wurden im Laufe der Evolution im Reich der Pflanzen, Tiere und Pilze entwickelt (Duncan et al. 2013). Die Modifizierung und Erweiterung des Importapparates ermöglichen es somit die spezifischen Bedürfnisse der unterschiedlichen Reiche zu erfüllen.

Im Pflanzenreich beinhaltet dies die Entwicklung von zwei einzigartigen Rezeptoren in der äußeren Membran pflanzlicher Mitochondrien, Tom20 und OM64. Tom20 stellt eine Untereinheit des TOM-Komplexes dar und fungiert in der Erkennung und Bindung von kernkodierten mitochondrialen Vorstufenproteinen (Heins and Schmitz 1996). Das Protein zeigt vergleichbare Funktionen zu der Rezeptorkomponente Tom20 aus *S.cerevisiae*, der Mechanismus der Proteinbindung, seine Struktur, sowie die Verankerung in die äußere Membran sind jedoch verschieden (Baker et al. 1990, Lister et al. 2007, Perry et al. 2008). Das pflanzliche Protein OM64 ist ein Rezeptor für zytosolische Chaperone und gehört zur Familie der TOC64 Proteine in *Arabidopsis* (Chew et al. 2004). Es ist scheinbar verantwortlich für den Übergang hydrophober mitochondrialer Proteine zur Importpore Tom40. Eine weitere wichtige Komponente, das Tom22 Protein, ist entscheidend für den Transport der Vorstufenproteine von den Rezeptorkomponenten des TOM-Komplexes zur Importpore Tom40. Experimentelle Analysen identifizierten das Tom9 Protein als ein pflanzen Ortholog von Tom22 (Jänsch et al. 1998). Im pflanzlichen System konnte eine Domäne für Tom9, welche für eine Bindung mit der Präsequenz von Vorstufenproteinen benötigt wird, nicht identifiziert werden. Tom9 scheint jedoch die Bindestelle des pflanzlichen Tom20 zu besetzen. Es wird vermutet, dass Aufgrund der Bindung einer Präsequenz an den Rezeptor Tom20 die Interaktion mit Tom9 verdrängt wird und somit Vorstufenproteine in der Nähe der Importpore angereichert werden können (Rimmer et al. 2011). Der MIA-Importweg wird über Mia40 und ERV1 reguliert. Beide Proteine sind essentiell für die Funktionsfähigkeit der Hefe. Für Pflanzen konnte gezeigt werden, dass der Signalweg nur mit dem ERV1 Protein allein funktionsfähig ist (Carrie et al. 2010). Des Weiteren konnte eine Kolo-kalisation von pflanzlichen Mia40 in den Mitochondrien und den Peroxisomen bestimmt werden. Eine essentielle Funktion des Proteins, wie es für die Hefe gezeigt wurde, scheint demnach nicht zu bestehen. Eine Verbindung zwischen der Translokase der äußeren Membran (TOM-Komplex) und der Translokase der inneren Membran (TIM17:23-Komplex) wird in der Hefe durch das scTim23 Protein vermittelt. Dieses hat eine N-terminale Verlängerung, welcher eine Interaktion mit dem TOM-Komplex ermöglicht. In der Pflanze ist eine solche Verlängerung der Sequenz nicht für Tim23 aber für das Protein Tim17 identifiziert worden. Die Funktion der C-terminalen Verlängerung von Tim17 ist bis dato zwar unbekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass es eine Verbindung zwischen äußerer und innerer Membran herstellt (Murtha et al. 2005).

Im Mitochondrium laufen neben der für die Zelle überlebenswichtigen Atmungskette weitere bedeutende Prozesse des Stoffwechsels ab. Eine Steuerung der Proteinzusammensetzung, sowie eine Anpassung der Synthese und des Imports von kernkodierten Proteinen, könnte die Funktionen der Mitochondrien und die Bedürfnissen der umgebenden Zelle koordinieren. Eine strenge Regulation der in Mitochondrien ablaufenden Prozesse scheint demnach essentiell zu sein. In der Zelle kann dies über ein Signalnetzwerk, welches Reize in zelluläre Signale umwandelt, gewährleistet werden.

1.2. Kalziumregulation in Pflanzen

Um auf Veränderungen der Umwelt, wie z.B. Licht, Temperatur, Salz und osmotischen Stress reagieren zu können, haben Organismen ein intra- und interzelluläres Netzwerk entwickelt, welches Informationen über wahrgenommene Reize in zelluläre Antworten umwandelt. Die dabei ausgelösten Signale werden vor allem über kleine organische oder anorganische Moleküle, den sogenannten sekundären Botenstoffe (Phospholipide, Zucker, Aminosäuren, zyklische Nukleotide), aufgenommen. Eine zelluläre Antwort beinhaltet zum Beispiel die Veränderungen von Enzymaktivitäten, Genexpression oder den Transport von Proteinen über Membranen (Bouche et al. 2005). In der Pflanzen zählt Kalzium zu den wichtigsten sekundären Botenstoffen (Berridge et al. 2000). Es kann nicht wie andere Botenstoffe verstoffwechselt werden und ist in erhöhter Konzentration in der Zelle schädlich für den Energiestoffwechsel (Clapham 1995). Um zu verhindern, dass Kalzium in hohen Konzentrationen unlösliche Komplexe mit Phosphaten bildet, werden Kalzium-Ionen (Ca^{2+} -Ionen) aktiv aus dem Zytosol in Kalziumspeicher wie die Vakuole und das Endoplasmatische Retikulum gepumpt. Die Ca^{2+} -Ionen Konzentration im Zytosol kann somit niedrig gehalten ($\sim 100\text{-}200\text{ nM}$) werden (McCormack and Braam 2003, DeFalco et al. 2010). Der große Konzentrationsunterschied zwischen den Kompartimenten (annähernd 10000 fache) sorgt wiederum dafür, dass durch zum Beispiel Kalziumkanäle in den Membranen schnelle Änderungen der Kalziumkonzentration im Zytosol ausgelöst werden können (Stael et al. 2012). Hierbei unterscheidet man Spannungs-gesteuerte, Spannungs-unabhängige und Ligand-gebundene Kanäle (Kudla et al. 2010). Neben den Kalziumkanälen gibt es den aktiven Transport von Ca^{2+} -Ionen. Die Ionen werden in diesem Fall aktiv über Ca^{2+} /Protonen Antiporter Systeme oder P-Type Ca^{2+} -ATPasen aus dem Zytosol transportiert. Durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Kalziumkanäle und Transportsysteme ist es der Zelle möglich, ein breites Spektrum verschiedenster Signale in differenzierte Kalzium-Signaturen umzuwandeln. Die meisten Proteine, die als Überträger von Kalziumsignalen dienen, tragen ein weit verbreitetes und hoch konserviertes Motiv, das EF-Hand Motiv. Es besteht aus einer Helix-Loop-Helix Struktur, welches ein Kalzium-Ion binden kann (Perochon et al. 2011). Eine Konformationsänderung des Kalzium-bindenden Proteins, ausgelöst durch die Anbindung des Botenstoffes, ermöglicht dem Protein im Laufe der Signalkaskade mit Zielproteinen interagieren zu können (Clapham 2007, DeFalco et al. 2010, Poovaiah B.W. and Yang 2013). In der Pflanze wurde eine Vielzahl

von EF-Hand-tragenden Proteinen identifiziert. Die wichtigste Gruppe gehört zur Familie der Calmoduline. Calmodulin ist ein hoch konserviertes, kleines (16-18 kDa) und saures Protein. Es umfasst zwei globulären Strukturen, die durch eine flexible, helikale Domäne verbunden sind. Jedes der globulären Enden trägt zwei EF-Hand Motive, die wiederum jeweils ein Ca^{2+} -Ion binden können (Day et al. 2002). Außerdem besitzt es keinerlei katalytische Aktivität, erst die Anbindung von Kalzium führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und somit zu einer Interaktion mit nachgeschalteten Zielproteinen (Perochon et al. 2011, Reddy et al. 2011). Neben den in *Arabidopsis* identifizierten sechs Calmodulinen, gibt es ungefähr 50 Calmodulin-ähnliche (CML) Proteine (McCormack and Braam 2003). Die CMLs sind relative kleine, zwischen 83 und 330 Aminosäuren lange Proteine, die vorwiegend aus EF-Hand Motiven bestehen. Sie weisen mindestens 16% identische Aminosäuren zu den klassischen Calmodulinen auf, zeigen jedoch innerhalb der Kalzium-bindenden Regionen einige Sequenzunterschiede auf. Die hohe Affinität zu Kalzium könnte in Folge dessen gemindert werden (McCormack et al. 2005). Die meisten der 50 CMLs haben 4 EF-Hand Motive. Die Kalzium-abhängigen Proteinkinasen (CDPKs) stellen eine weitere Gruppe Kalzium-bindender Proteine dar (Cheng et al. 2002). In *Arabidopsis* wurden 34 Gene identifiziert die für CDPKs kodieren. Sie besitzen eine N-terminale variable Domäne, eine katalytischen Kinase Domäne, eine Autoinhibitionsdomäne und eine regulatorische Calmodulin-ähnliche Domäne. Die EF-Hand Motive befinden sich innerhalb der regulatorischen Domäne und erlauben die direkte Aktivierung der CDPKs durch Kalzium. Die meisten identifizierten CDPKs besitzen vier dieser Motive. In *Arabidopsis* konnten im weiteren 10 Gene identifiziert werden, welche für Calcineurin B-ähnliche Proteine (CBLs) kodieren (Luan et al. 2002). CBLs sind kleine Proteine, die typischerweise drei EF-Hand Motive tragen. Eine weitere Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine gehören zur Familie der SUBs (Short Under Blue Light) und SULs (SUB-ähnlich) Proteinen (Guo et al. 2001). SUB1 ist fähig Kalzium zu binden und spielt eine wichtige Rolle im Signalweg der Photorezeptoren. Neben den hier aufgeführten wichtigsten Proteinfamilien gibt es eine Vielzahl von weiteren EF-Hand Motiv tragenden Proteinen in Pflanzen. Es wird vermutet das über 250 solcher Proteine in *Arabidopsis* zu finden sind (Day et al. 2002). Die beträchtliche Anzahl an Kalzium-bindenden Proteinen innerhalb eines sessilen Organismus spiegelt dessen Bedürfnis wieder, den gesamten Stoffwechsel, die Entwicklung und das Wachstum als Antwort auf Veränderungen der Umwelt zu regulieren.

Die Kalziumregulation ist eine spezifische Eigenschaft eukaryotischer Zellen und wurde bis dato nicht für Prokaryonten beschrieben. Dennoch gibt es immer mehr Hinweise auf die Existenz von Kalziumregulierten Prozessen in den Organellen prokaryotischen Ursprungs, Chloroplasten und Mitochondrien (Bussemer et al. 2009). So wurde gezeigt, dass der Proteinimport Prozess sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten durch Kalzium und Calmodulin reguliert wird (Kuhn et al. 2009, Chigri et al. 2005). Es gibt im Weiteren Hinweise für das Auftreten von Kalziumsignale im Kern und in Peroxisomen.

1.3. Die PRAT Gen Familie

In *Arabidopsis* codieren 17 Loci für Proteine der Präprotein und Aminosäure Transporter (PRAT) Familie (Rassow et al. 1999). Diese Proteinfamilie entstammt wahrscheinlich einem einzigen eubakteriellen Vorfahren, der Aminosäure-Permease LivH. LivH ist ein integrales Plasmamembran-Protein von 308 Aminosäuren, welches direkt in der Aufnahme von verzweigten Aminosäuren beteiligt ist (Adams et al. 1990). PRAT-Proteine zeichnen sich durch vier Transmembrandomänen verbunden durch drei kurze hydrophile LOOPS und einer charakteristischen PRAT-Domäne ([G/AX₂[F/Y]X₁₀RX₃DX₆[G/A/S]GX₃G; X bezeichnet beliebige Aminosäuren) aus. Außerdem erfüllen sie vorrangig Funktionen in der Translokation von Präproteinen sowie dem Transport von Aminosäuren über die äußeren und inneren Membranen von Chloroplasten und Mitochondrien. Die identifizierten PRAT-Proteine aus *Arabidopsis* zeigen eine erhebliche Varianz in ihrer Größe (133 bis 261 Aminosäuren), ihrer Struktur und der Lokalisierung (Duncan et al. 2013). Von allen 17 Genen kodieren zehn für Proteine aus dem Mitochondrium, sechs zeigen eine chloroplastidäre Lokalisierung und eines konnte in beiden Organellen detektiert werden (Murcha et al. 2014a). Nur für sieben der identifizierten Gene konnte im Weiteren eine PRAT-Domäne aufgezeigt werden, vier weitere tragen eine degenerierte Variante. Das OEP16 ist eines der bekanntesten PRAT-Protein der Chloroplasten. Es konnte in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten der Erbsen lokalisiert werden und bildet einen selektiven Kanal für Aminosäuren (Pohlmeyer et al. 1997). Die Funktion des Proteins ist bis dato ungeklärt, es wird vermutet, dass es eine wichtige Rolle während des Transportes der POR A (Protochlorophyllide) Oxidoreductase in den Chloroplasten spielt. Weiterhin konnten die Tim17 Homologen, PRAT1.1 und PRAT1.2, im Chloroplasten identifiziert werden (Pudelski B. and K. 2010). Sie sind durch eine Struktur von vier Transmembrandomänen charakterisiert und tragen eine spezifische Tim17 Domäne (Finn et al. 2008). Das Fehlen eines Signalpeptids zeichnet sie im Weiteren aus. Ihre Funktion ist weitestgehend unbekannt, es wird angenommen, dass sie an einem alternativen Importweg der Chloroplasten beteiligt sind. Die 11 in Mitochondrien codierten PRATs können in drei Unterfamilien basierend auf Homologie-Untersuchungen mit *S.cerevisiae* unterteilt werden: TIM17, TIM23, und TIM22. Drei Gene kodieren für TIM17 (At1g20250, At2g37410 und At5g11690), drei Gene kodieren TIM23 (At1g72750, At1g17530 und At3g04800) und zwei Gene kodieren TIM22 (At3g10110 und At1g18320). Die drei Isoformen von TIM23 zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit (70-92%) untereinander (Murcha et al. 2007). Nur eines der drei Proteine trägt eine PRAT-Domäne (At3g04800), während die beiden anderen eine degradierte Form beinhalten. Alle drei Isoformen scheinen überlappende Funktionen in der Zelle einzunehmen, denn eine Mutation von jeweils zwei Proteinen führt zur Letalität (Wang et al. 2012). Eine N-terminale Verlängerung, wie sie bei Tim23 aus *S.cerevisiae* zu finden ist, fehlt bei allen drei Proteinen. Die Verbindung zwischen äußerer und innerer Membran wird hier durch die C-terminale Verlängerung von Tim17 (At2g37410) übernommen (Murcha et al. 2005). Drei weitere Gene zeigen zwar keine Homologen in *S.cerevisiae* oder *H.sapiens*, jedoch konnte

eine starke Ähnlichkeit zu den bereits bekannten PRATs in *Arabidopsis* festgestellt werden. Die Proteine PRAT2.1 und PRAT2.2 tragen innerhalb des C-Terminus eine dem SAM-Protein ähnliche Domäne (steriles alpha Motiv) und zeigen eine duale Lokalisierung innerhalb der inneren Hüllmembran der Chloroplasten und der inneren Membran der Mitochondrien (Pudelski B. and K. 2010). Sie sind ebenfalls durch eine Struktur von vier Transmembrandomänen und einer TIM17-Domäne charakterisiert. Eine Funktion innerhalb des Aminosäuretransportes wird außerdem vermutet. Des Weiteren konnten die Proteine PRAT3 und PRAT4 in den Mitochondrien identifiziert werden. Sie erfüllen zwar die charakteristischen Eigenschaften der PRAT-Familie, ihre Funktion ist jedoch unklar. PRAT4 könnte eine Rolle während des Proteinimportes spielen.

Ausgenommen von TIM17, TIM23 und OEP16 sind die Funktionen der Mitglieder der gesamten PRAT-Proteine unbekannt. Die relativ hohe Anzahl von Genen welche für PRAT-Proteine in *Arabidopsis* kodieren weist jedoch darauf hin, dass auch die Funktionen der Proteine stark ausgeweitet wurden. So zeigen Untersuchungen der Transkriptionsrate im Verlauf der Blattentwicklung, dass einige Proteine womöglich bedeutsame Rollen während des Austausches von Metaboliten und anderen Molekülen zwischen Mitochondrien und Chloroplasten spielen könnten (Duncan et al. 2013).

Ziel der Arbeit

Kalzium ist der universelle sekundäre Botenstoff in allen eukaryotischen Organismen. Er spielt nicht nur eine bedeutende Rolle in verschiedenen Aspekten des Pflanzenwachstums und während der Pflanzenentwicklung, sondern ist gleichzeitig ein Mediator von Stressantworten welche durch biotische und abiotische Stimuli ausgelöst werden können (Tianbao Yang 2003). Stress und die daraus resultierende Ausschüttung von Kalzium in das Zytosol wird durch sogenannte Sensoren in der Zelle wahrgenommen. Einer der am besten charakterisierten Kalzium-Sensoren in eukaryotischen Zellen ist das Calmodulin. Neueste Untersuchungen haben die Beteiligung der Organellen an dem Kalzium/Calmodulin-Netzwerk bestätigen können (Stael et al. 2012). Der Import von Kern-codierten Proteinen in die innere Membran oder Matrix von Mitochondrien ist beispielsweise durch Kalzium und Calmodulin reguliert (Kuhn et al. 2009). Diese Regulation findet innerhalb der inneren Membran der Mitochondrien an dem TIM22- und TIM23-Komplex statt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es Komponenten zu identifizieren, welche an dieser Kalzium/Calmodulin-Regulation des Importprozesses in Mitochondrien beteiligt sind. Des Weiteren sollen die Interaktionen zwischen identifizierten Komponenten mit Calmodulin näher untersucht und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in höchstmöglicher Qualität von namhaften Herstellern bezogen. Spezielle Chemikalien wurden von folgenden Firmen erworben:

Tabelle 2.1. Übersicht der in dieser Arbeit speziell erworbenen Chemikalien

Produkt	Verwendung	Hersteller
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Inhibierung von Proteasen	Roche (Mannheim, Deutschland)
Mitotracker® CMX Ros	Anfärbung von Mitochondrien	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
EDC(1Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid)	Quervernetzungsexperimente	Thermo Scientific (Rockford, IL USA)
S-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid)	Quervernetzungsexperimente	Thermo Scientific (Rockford, IL USA)

2.1.2. Enzyme und Kits

Folgende Enzyme und Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2.2. Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Kits

Produkt	Verwendung	Hersteller
Restriktionsenzyme	Restriktionsverdau	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland) und New England Biolabs (Boston, USA)
DNA-Polymerasen	Polymerasekettenreaktion	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland) und New England Biolabs (Boston, USA)
T4-DNA Ligase	Ligation	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Cellulase und	Abbau der pflanzlichen	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Mazerase	Zellwand	
Quick Lyse [®] Miniprep Kit (250)	Isolation von DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	Quiagen (Maryland, USA)
Nucleobond Kit PC 100	Isolation von DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin [®] Gel and PCR clean-up Kit	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

2.1.3. Bakterien- und Hefestämme

Zur Vervielfältigung von DNA, Expression rekombinanter Proteine und transienter Transformation von Tabak wurden folgende Bakterien-bzw. Hefestämme verwendet.

Tabelle 2.3. Überblick der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme

Produkt	Verwendung	Hersteller
Bakterienstamm <i>E.coli</i> DH5alpha	Vervielfältigung von DNA	Stratagene (La Jolla, USA)
Bakterienstamm <i>E.coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)- RIPL	Expression von rekombinanten Proteinen	Stratagene (La Jolla, USA)
Agrobakterienstamm LBA 1334	Transiente Transformation von <i>N.benthamiana</i>	Bereitstellung der AG Ott LMU München Dep. Bio I
Hefestamm NMY51	Vervielfältigung von DNA in Hefezellen	Dualsystems Biotech (Schlieren, Schweiz)

2.1.4. Verwendete Vektoren

In dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind im folgendem dargestellt:

Tabelle 2.4. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

Vektor	Hersteller	Besonderheit	Restriktions- schnittstellen	Antibiotika- resistenz
pMal-c 5	New England Biolabs (Boston, USA)	C-terminaler MBP-tag	EcoRI NdeI	Ampicillin
pBT3-SUC/-C/-N	DUALsystems Biotech (DUALmembrane kit 3) (Schlieren, Schweiz)	C-terminale LexA DNA Bindedomäne	SfiI	Kanamycin

pPR3-SUC/-C/-N pAL-Alg5, pDL2-Alg5	DUALsystems Biotech (DUALmembrane kit 3) (Schlieren,Schweiz)	N-terminaler HA Epitop tag	SfiI	Ampicillin
pBIN19saGFP _{1-10C}	Bereitgestellt von S. Stael	C-terminales β -Faltblatt 1-10 von GFP	ApaI und NotI	Kanamycin
pBIN19saGFP _{11C} pBIN19saGFP _{11N}	Bereitgestellt von S. Stael	C-terminales bzw. N-terminales β -Faltblatt 11 von GFP	ApaI und NotI	Kanamycin

2.1.5. Verwendete Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden in dieser Arbeit kloniert oder nach freundlicher Bereitstellung verwendet:

Tabelle 2.5. Liste der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte

Die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäuren; VL: vollllanges Protein, AS: Aminosäure, mit * gekennzeichnete Konstrukte wurden bereitgestellt. Für die Klonierung wurde CDS (codierende DNS Sequenz) verwendet.

Bezeichnung	Vektor	Verwendung	Beschreibung
atTim23.2 saGFP _{1-10C}	pBIN19saGFP _{1-10C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
atTim23.2 saGFP _{11C}	pBIN19saGFP _{11C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
atTim23.2 saGFP _{11N}	pBIN19saGFP _{11N}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
atMia40 saGFP _{1-10C}	pBIN19saGFP _{1-10C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL Mia40 AS 1-162 At5g23395
atMia40 saGFP _{11C}	pBIN19saGFP _{11C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL Mia40 AS 1-162 At5g23395
atOGDE1 saGFP _{1-10C} *	pBIN19saGFP _{1-10C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	OGDE1 AS 1-66
atOGDE1 saGFP _{11C} *	pBIN19saGFP _{11C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	OGDE1 AS 1-66

atCAM4 saGFP _{1-10C} *	pBIN19saGFP _{1-10C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL CAM4 AS 1-159 At1g66410
atCAM4 saGFP _{11C} *	pBIN19saGFP _{11C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL CAM4 AS 1-159 At1g66410
atCML30 _{ΔM2/M3} saGFP _{1-10C} *	pBIN19saGFP _{1-10C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL CML30 AS 1-187 Methionin 2 und 3 ausgetauscht gegen Isoleucin At1g15680
atCML30 _{ΔM2/M3} saGFP _{11C} *	pBIN19saGFP _{11C}	Expression in <i>N.benthamiana</i>	VL CML30 AS 1-187 Methionin 2 und 3 ausgetauscht gegen Isoleucin At1g15680
pMal-atTim23.2(1-188) *	pMal-c 5	Expression in <i>E.coli</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pMal-atTim23.2(1-188)-strep	pMal-c 5	Expression in <i>E.coli</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pMal-atTim17.2(1-243)-strep *	pMal-c 5	Expression in <i>E.coli</i>	VL Tim17.2 AS 1-243 At2g37410
pMal-atTim23.2(1-70)-strep	pMal-c 5	Expression in <i>E.coli</i>	Tim23.2 AS 1-70 At1g72750
pMal-atTim23.2(80-110)-strep	pMal-c 5	Expression in <i>E.coli</i>	Tim23.2 AS 80-110 At1g72750
pMal-atTim23.2(120-140)-strep	pMal-c 5	Expression in <i>E.coli</i>	Tim23.2 AS 120-140 At1g72750
pBT3-atTim23.2-SUC	pBT3-SUC	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pBT3-atTim23.2-C	pBT3-C	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pBT3-atTim23.2-N	pBT3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pPR3-atTim23.2-SUC	pPR3-SUC	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pPR3-atTim23.2-C	pPR3-C	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750

pPR3-atTim23.2-N	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 At1g72750
pPR3-pAI-Alg5-C*	pPR3-C	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Alg5 AS 1-334 YPL227C
pPR3-pDL-Alg5-C*	pPR3-C	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Alg5 AS 1-334 YPL227C
pPR3-atCML5-N *	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL CML5 AS 1-216 Mit Stopcodon At2g43290
pPR3-pPR3-atTim23.2(76-188)-N	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	Tim23.2 AS 76-188 At1g72750
pPR3-atTim23.2(1-151)-N	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	Tim23.2 AS 1-151 At1g72750
pPR3-atTim23.2 (Δ C/A ₁₅₂)-N	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	VL Tim23.2 AS 1-188 Δ Cys/Ala ₁₅₂ At1g72750
pPR3-atTim23.2 (Δ 62-110)-N	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	Tim23.2 Δ AS 62-110 At1g72750
pPR3-atTim23.2 (Δ 110-152)-N	pPR3-N	Expression in <i>S.cerevisiae</i>	Tim23.2 Δ AS 110-152 At1g72750

2.1.6. Größenmarker und Säulenmaterial

Für die Größenbestimmung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde der „Low Molecular Weight“-Marker von PegLab (Erlangen, Deutschland) und der „Page Ruler Plus prestained Protein ladder“ von New England Biolabs (Boston, USA) verwendet. Die Größe von DNA Fragmenten in Agarosegelen wurde mit λ -Phagen DNA, welche mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII verdaut wurde, ermittelt. Proteine welche mit Streptavidin-tag versehen waren, wurden über Strep-Tractin^R Sepharose^R (IBA, Göttingen) aufgereinigt. Die Aufreinigung von Proteinen fusioniert mit einem MBP-tag (Maltose bindendes Protein) erfolgte über Amylose-Resin der Firma New England Biolabs (Boston, USA). Kopplung und Anbindungsversuche wurden mittels Calmodulin-Sepharose von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Die Anzucht von Bakterienkulturen, die DNA-Extraktion durch alkalische Lyse und die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA wurde nach (Sambrook and Girling 2001) durchgeführt. Die *E.coli* Zellen wurden mit Plasmiden nach Pope und Kent transformiert (Pope and Kent 1996). Die Herstellung von chemisch-kompetenten *E.coli*-Zellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan 1983). Elektrokompetente *A.tumefaciens* wurden hergestellt und transformiert gemäß der Anleitung des „MicropulserTM Electroporation Apparatus Operation Instructions and Application Guide“ der Firma Bio-Rad (München, Deutschland). Die Klonierung von DNA-Fragmenten, die Aufreinigung von PCR-Produkten, die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen und der Restriktionsverdau von DNA-Stücken, erfolgte nach Standardmethoden oder nach Herstellerangaben der verwendeten Enzyme und Kits.

2.2.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die Polymerasekettenreaktion nach Sambrook und Russel, sowie nach Angabe der Enzymhersteller, durchgeführt (Sambrook and Girling 2001). Jeder Zyklus begann mit dem Erhitzen der Proben für zwei Minuten auf 96°C, um die DNA zu denaturieren. Nach Verringerung der Temperatur auf das primer-spezifische Optimum, erfolgte das Annealing der Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, gefolgt von einer Synthetisierungsphase bei 72°C. Die neu synthetisierten Moleküle wurden durch erneute Temperaturerhöhung auf 96°C von der Ausgangs-DNA gelöst und dienten so selbst als Matrize für den nächsten Elongationsschritt. Die Wiederholungszahl der Zyklen betrug 25- bis 35-mal, wodurch die gewünschte DNA-Sequenz exponentiell vervielfacht wurde.

2.2.1.3. Klonierungsstrategien

Für die Klonierungen wurde cDNA, aus mRNA revers transkribiert, oder genomische DNA aus *A.thaliana* als Matrize eingesetzt. Die DNA wurden mittels Restriktionsverdau und Ligation in ihre Zielvektoren nach Angaben der Enzymhersteller kloniert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der entstandenen Klone durch den Sequenzierservice des Departments Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität München. Für die Erzeugung von verkürzten atTim23.2-Konstrukten wurde die DNA-Sequenz des volllangen Proteins Tim23 aus *Arabidopsis thaliana* als Template verwendet.

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Färbemethoden

Mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen und zu analysieren. Hierbei wurde die Methode nach Laemmli angewendet (Laemmli 1970). Die Proteinproben wurden mit SDS-Solubilisierungspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS und 0,01% (w/v) Bromphenol Blau) versetzt und für zwei Minuten bei 96°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine elektrophoretisch auf 10 – 12,5%-igen SDS-Gelen (30% (v/v) Acrylamid, 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED) in Gellaufkammern versetzt mit SDS-Laufpuffer (1,92 M Glycerin, 250 mM Tris, 1% (w/v) SDS).

Coomassie-Blaufärbung

Die Anfärbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte direkt im Gel für 10-20 Minuten in Coomassie-Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure, 0,18% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250). Anschließend erfolgte die Entfärbung mit 10% (v/v) Isopropanol und 10% (v/v) Essigsäure, bis die Proteine gut sichtbar waren. Die Gele wurden mehrfach in ddH₂O gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Silberfärbung

Neben der Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue, wurde die sensitivere Silberfärbung angewendet (Blum et al. 1987). Nach 30-60 minütiger Fixierung der Gele in Fixier-Lösung (10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure), sowie mehrfacher Waschschrte in 50%-igen Ethanol, wurden diese eine Minute in Sensitivierungspuffer (0,02% (w/v) Na₂S₂O₃) vorbehandelt. Es folgten drei Waschschrte in ddH₂O für jeweils 20 Sekunden, woraufhin die Gele für weitere 20 Minuten in frisch angesetzter Färbelösung (0,2% (w/v) AgNO₃, 0,028% (v/v) Formaldehyd) inkubiert und anschließend noch zweimal in ddH₂O für je 20 Sekunden gewaschen wurden. Die Entwicklung erfolgte in einer Lösung bestehend aus 37,5% (w/v) Na₂CO₃, 0,028% (v/v) Formaldehyd und 0,0075% (w/v) Na₂S₂O₃, bis die Protein-Banden sichtbar waren. Die Reaktion wurde mit Fixier-Lösung gestoppt, die Gele anschließend mehrfach in ddH₂O gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

2.2.2.2. Affinitätschromatographien

Affinitätschromatographie an Amylose-Resin

Proteine, welche mit einem MBP-tag versehen wurden, konnten mittels Amylose-Resin aufgereinigt werden. Die Bakterien, welche das Protein rekombinant exprimiert hatten, wurden zunächst zehn Minuten bei 4000 x g pelletiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 15 ml Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 75 mM 6-Aminohexansäure) resuspendiert und anschließend die Zellen mittels einer „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen, wurde das Lysat für 20 Minuten bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde dann in einem Verhältnis von 1:6 mit Puffer gemischt und auf die Säule, welche im Vorhinein mit 500µl Amylose-Resin beladen und äquilibriert wurde, geladen. Der Durchlauf wurde gesammelt und nochmal auf die Säule beladen. Nach einem Waschdurchgang mit 10 ml des Säulenpuffers, erfolgte die Elution mit 10 ml Säulenpuffer versehen mit 10 mM D-Maltose. Die acht Eluate wurden zu jeweils 250 µl aufgefangen. Um die D-Maltose und die 6-Aminohexansäure von den aufgereinigten Proteine zu entfernen und diese gleichzeitig umzupuffern, wurden sie über Nacht in einem Liter 50 mM Hepes pH 7,5 und 100 mM NaCl dialysiert. Am Folgetag wurden die Proteine dann für 15 Minuten bei 15 000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand und das Pellet mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert(siehe 2.2.2.1).

Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Mit Streptavidin-tag versehende Proteine wurden mittels Strep-Tractin^R Sepharose^R direkt aus den Bakterien aufgereinigt. Zunächst wurden die Bakterien, welche das Protein rekombinant exprimiert haben, zehn Minuten bei 4000 x g pelletiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 10 ml Wash-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und anschließend die Zellen mittels Sonifizierung aufgeschlossen. Um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen wurde das Lysat für 20 Minuten bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Anschließend wurden die Proteine nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (IBA, Göttingen). Um das D-Biotin von den aufgereinigten Proteine zu entfernen und diese gleichzeitig umzupuffern, wurden diese über Nacht in einem Liter 50 mM Hepes pH 7,5 und 100 mM NaCl dialysiert. Am Folgetag wurden die Proteine dann für 15 Minuten bei 15 000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand und das Pellet mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (siehe 2.2.2.1).

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde mit dem ÄKTATM Pure System von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Analysen der Komplexbildung wurde die Superdex-200 10/300 GL und ein Puffer aus 20 mM Hepes und 200 mM NaCl (pH 7,5) verwendet.

Für das Experiment wurde das atTim23.2 pMal-c/strep Konstrukt ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und die verkürzten Konstrukte rekombinant exprimiert, über Streptavidin-Agarose aufgereinigt und anschließend dialysiert. Das Protein wurde dann zu $50\mu\text{l}$ auf die Säule geladen. Nach Beendigung des Laufes wurde mit jeweils $250\mu\text{l}$ eluiert.

Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose (aus dem Bakterienpellet)

Der Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose wurde nach der Methode von Wang in veränderter Form durchgeführt (Wang et al. 2005).

Jeweils 10-30 mg des Bakterienpellets, welches das nach 2.2.3.1 exprimierte Volllängeprotein atTim23.2 sowie die verkürzten atTim23.2-Konstrukte enthielt, wurde mit 2 ml Pull-down-Puffer (50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, Proteaseinhibitortablette) versetzt, resuspendiert und für 20 Sekunden dreimal sonifiziert. Nach anschließender Zentrifugation der Bakteriensuspension für 20 Minuten bei $10\,000 \times g$ und 4°C , wurden $500\mu\text{l}$ der Lösung mit $100\mu\text{M}$ CaCl_2 bzw. 5mM EDTA/EGTA versetzt. Nach Zugabe von $50\mu\text{l}$ Calmodulin-Agarose, welche zuvor mit Pull-down-Puffer äquilibriert wurde, erfolgte die Inkubation der Ansätze über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Das Säulenmaterial wurde am Folgetag nach Zentrifugation bei $1000 \times g$ für eine Minuten gesammelt und siebenmal mit je $300\mu\text{l}$ Pull-down-Puffer (50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, Proteaseinhibitortablette, $100\mu\text{M}$ CaCl_2 bzw. 5mM EDTA/EGTA) gewaschen. Spezifisch an die Calmodulin-Agarose gebundene Konstrukte wurden kompetitiv mit $10\mu\text{M}$ Calmodulin vom Schweinegehirn (Enzo Life Sciences, Lörrach/Deutschland) im Pull-down-Puffer eluiert. Hierfür wurde das Gemisch 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 90 Sekunden bei $1000 \times g$ abzentrifugiert. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert und die Gele durch Coomassie- oder Silberfärbung angefärbt.

2.2.2.3. Quervernetzungsversuch

Nach der Methode von Arazi erfolgten die in dieser Arbeit durchgeführten Quervernetzungsversuche (Arazi et al. 1995). Hierfür wurde rekombinant hergestelltes Volllängeprotein oder verkürzte atTim23.2-Konstrukte äquivalent zu $5\mu\text{g}$ Protein, mit $5\mu\text{M}$ Schweinegehirn-Calmodulin versetzt und je nach Versuchsbedingungen mit $0,1\text{ mM}$ Kalzium bzw. 5 mM EDTA/EGTA behandelt. Der Ansatz wurde mit 50 mM HEPES pH 7,5 auf $30\mu\text{l}$ aufgefüllt. Anschließend wurden die verschiedenen Versuchsansätze für eine Stunde auf Eis inkubiert und dann entweder mit dem 0Å Quervernetzungsgemisch aus EDC (2 mM Endkonzentration) und S-NHS (5 mM Endkonzentra-

tion) oder 50 mM HEPES pH 7,5 vermischt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von SDS-Solubilisierungspuffer wurde die Reaktion gestoppt. Zur Analyse der Proben wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt.

2.2.3. Zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Heterologe Expression von rekombinanten Protein

Die heterologe Proteinexpression erfolgte in *E.coli* Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Die mit dem Plasmid transformierten Zellen einer Übernachtskultur wurden in 100 ml LB-Medium, mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotika, angeimpft und bei 37°C bis zu einem OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 angezogen (Bertani 1951). Die Expression wurde anschließend durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Nach drei Stunden wurde die Bakterienkultur für 15 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert und das Pellet in Stickstoff eingefroren. Zur Überprüfung des Erfolges der Expression wurden Proben vor (0Std Überstand/Pellet) bzw. nach der Induktion (3Std Überstand/Pellet) auf ein 12 – 15% SDS-Gel aufgetragen und analysiert.

2.2.3.2. Analyse der Topologie von atTim23.2 durch saGFP System

Zur Untersuchung der Topologie von atTim23.2 sowie zur Analyse der Lokalisation von CML30 *in vivo* wurde das selbst assemblierende GFP-System (saGFP-System) verwendet (Cabantous et al. 2004). Hierbei wird das GFP (Grün-fluoreszierende Protein) in zwei unterschiedlich große Teile gespalten: ein große Teil bestehend aus β-Faltblatt 1 bis 10 und ein kleiner Teil bestehend aus dem β-Faltblatt 11. Fusionskonstrukt zwischen den verschiedenen Gensequenzen mit den zwei unterschiedlichen Gensequenzen des Grün-fluoreszierenden-Proteins (GFP) im binären Vektor pBIN19 wurden hergestellt. Zur Kontrolle der Lokalisation wurden folgende Markerproteine verwendet: das cytosolische Protein CAM4 (Calmodulin4); Mia40, ein Protein aus dem IMR der Mitochondrien; die Präsequenz des mitochondrialen Matrixproteins OGDE1 (2-Oxo-glutarat-hydrogenase E1).

Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

In einem ersten Schritt wurden alle Plasmide der verschiedenen saGFP-Konstrukte durch Elektroporation in *A.tumefaciens* des Stammes LBA1334 transformiert (Bertani 1951). Im nächsten Schritt erfolgte die Anzucht der bereits transformierten Agrobakterien in 5-10 ml LB-Medium, welches zuvor mit 50 mg/ml Kanamycin versetzt wurde, bei 28°C über Nacht. Am Folgetag wurden die Agrobakterien für 15 min bei 3000 x g pelletiert und mit Agromix (10 mM MES-KOH pH 5,6, 10 mM MgCl₂, 150 µM Acetosyringon) auf eine OD₆₀₀ = 1 eingestellt. Anschließend wurden diese für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln im Dunkeln in-

kubiert. Für die Co-Expression der saGFP-Konstrukte 1-10 und 11 wurden diese eins zu eins gemischt und in drei bis vier Wochen alten *N.benthamiana* infiltriert. Die behandelten Pflanzen wurden gut gewässert, über Nacht im Dunkeln stehen gelassen und am darauffolgenden Tag im Gewächshaus für 48 Stunden unter normalen Lichtbedingungen zur Expression gelagert.

Protoplastenisolation

Zur Lokalisationsbestimmung der saGFP-Konstrukte wurden aus den zuvor infiltrierten Blättern Protoplasten nach Koop isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Koop et al. 1996). Zur Überprüfung der mitochondriellen Lokalisation erfolgte anschließend eine 30 minütige Inkubationszeit mit dem Mitotracker[®]CMX Ros (Endkonzentration 125 nM, Stock gelöst in DMSO).

2.2.4. Split Ubiquitin System

Zur Untersuchung spezifischer Protein-Protein-Interaktionsstudien von Membranproteinen *in vivo*, wurde das „Dualmembrane System“ von Dualsystems Biotech in Variation verwendet (www.dualsystems.com).

2.2.4.1. Nährmedien und Lagerung von Hefezellen

Für die Anzucht von Hefen wurden verschiedene Flüssigmedien verwendet: das Vollmedium YPDA (2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glukose, 0,004% Adeninsulfat) zur Transformation von untransformierten Hefestämmen, und das synthetische Minimalmedium (SD-Medium: 0,7% Yeast nitrogen base w/o amino acids, 0,1% Dropout-Mix, 2% Glukose) für die spezifische Selektion von transformierten Zellen. Für die Kultivierung auf Platten wurden dem Flüssigmedium 2% Agar zugegeben. Zur Herstellung der Minimalmedien SD-Leu, SD-Trp, SD-Leu/Trp, SD-Leu/Trp/ Ala/ His wurde folgender Dropout-Mix verwendet:

Tabelle 2.6. Zusammensetzung des Dropout-Mix

	4,3% (w/w)	
Arginin	Asparagin	Asparaginsäure
Cystein	Glutamin	Glutaminsäure
Glycerin	Myo-Inositol	Lysin
Methionin	Phenylalanin	Prolin
Serin	Threonin	Tyrosin
Urazil	Valin	
	8,5%	
Isoleucin		
	0,4%	
Para-Aminobenzoesäure		
	1%	
Adenin		

Dem jeweils verwendeten Dropout-Mix wurden entsprechend der Experimente die Aminosäuren Leucin, Tryptophan, Alanin und Histidin zugesetzt.

Zur kurzfristigen Lagerung der Hefestämme (bis zu vier Wochen), wurden diese auf YPDA-Agar-Platten ausgestrichen, bei 30°C für zwei bis drei Tage inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung von Hefen wurden Glycerin-Stockkulturen angelegt. Dazu wurden 5 ml YPDA-Medium mit den entsprechenden Hefekolonien angeimpft und über Nacht bei 30°C bis zu einer $OD_{600} = 1,5$ inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l der Kultur mit 500 μ l 60%-igen Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.4.2. Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Kompetente Hefezellen lassen sich im Labor mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode (Gietz and Schiestl 1991) herstellen.

Herstellung kompetenter Hefezellen

Eine 5 ml YPDA-Vorkultur wurde zunächst mit ein bis drei Hefekolonien der zu transformierenden Zellen im Inkubationsschüttler bei 220 rpm und 30°C über Nacht inkubiert. Nach Erreichen der stationären Phase wurde dann die Hefesuspension auf eine $OD_{600} = 0,15$ in 50 ml YPDA-Medium verdünnt und für weitere vier bis fünf Stunden bei 30°C und 220 rpm inkubiert, bis eine $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ erreicht wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt für drei Minuten bei

3000 rpm und 4°C, wurde das Pellet in ein Volumenanteil sterilem H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift des Zellpellets in $\frac{1}{4}$ Volumenanteil LiSorb (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol) und ein erneuter Zentrifugationsschritt, wobei der Überstand vorsichtig und vollständig mit der Pipette entfernt werden sollte. Anschließend wurden die Zellen in LiSorb resuspendiert (300 µl pro 50 ml Hauptkultur) und mit Carrier DNA (2mg/ml Deoxyribonucleinsäure-Natrium-Salz Type III aus Lachssperma), welche vorher für 5 min bei 100°C erhitzt wurde versetzt (7 µl pro 50 ml Hauptkultur). Zum Schluss wurden die Zellen zu je 50 µl aliquotiert, direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Transformation kompetenter Hefezellen

Für die Transformation von kompetenter Hefezellen wurden diese mit ein bis zwei µg der zu untersuchenden Plasmid-DNA und 300 µl LiPEG (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 40% PEG4000) gut gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 35 µl DMSO zugefügt und ein Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Die Zellen wurden dann für ein bis zwei Minuten bei 4000 rpm pelletiert und in 100-200 µl 0,9% NaCl aufgenommen. Zur Analyse der Hefesuspension wurden diese auf Selektionsplatten aufgebracht. Die Inkubation erfolgt 3 - 4 Tage bei 30°C bis Einzelkolonien sichtbar waren.

2.2.4.3. Klonierungsstrategien

Die verwendeten Plasmid-Vektoren für das Split-Ubiquitin-System wurden in Anlehnung an das „DUALmembrane kit 3 user manual“ der Herstellerfirma kloniert. Für die Erzeugung der atTim23.2-Konstrukte wurde die DNA-Sequenz des volllangen Proteins Tim23.2 aus *Arabidopsis thaliana* eines bereits vorhandenen Klon als Template verwendet. Die Klonierung der Tim23.2(Δ 62-110 und Δ 110-152) Konstrukte erfolgte durch „overlap extension PCR“.

2.2.4.4. Split-Ubiquitin-Assay

Für den Split-Ubiquitin-Assay wurden die Hefezellen zunächst wie unter 2.2.3.2 beschrieben kompetent gemacht und anschließend mit dem „Bait“-Vektor, welcher für die C-terminale Hälfte des Ubiquitins kodiert und den artifiziellen Transkriptionsfaktor LexA-VP16 trägt, und dem „Prey“-Vektor, welcher für eine mutierte Form der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins kodiert, ko-transformiert. Transformierte Zellen wurden dann in 100 µl 0,9% NaCl aufgenommen und je 30 µl auf SD-Leu/Trp Transformationskontrollplatten und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten ausgestrichen bzw. gespottet (0,7% Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren, 0,1% des jeweiligen Dropout-Mixes, 2% Glucose, 2% Agar) und für 3-4 Tage bei 30°C angezogen. Als Reportergene dienen die auxotrophen Wachstumsmarker *HIS3*- und *ADE2*, welche das Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin und Alanin ermöglichen. Außerdem gibt

es den chromogenen Marker lacZ, welcher für das Enzym β -Galactosidase codiert und die Durchführung eines β -Galaktosidase Filter Lift Assay ermöglicht. Die Korrekte Insertion und Expression des „Bait“-Konstruktes in der Hefemembran wurde zuvor mittels positiv Kontrollvektor, welcher für eine nicht-mutierte Form der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins codiert, getestet. Die Kotransformation des „Bait“-Konstruktes mit einem negativen Kontrollvektor sollte zu keinem Wachstum auf den Interaktionsplatten führen. Mittels leeren Kontroll-„Prey“-Vektors wurde weiterhin auf Autoaktivierung getestet.

2.2.4.5. β -Galaktosidase Filter Lift Assay

Mit Hilfe des Filter Lift Assays können Hefezellen, welche auf den SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten Kolonien bildeten, auf ihre Aktivität hinsichtlich ihrer β -Galaktosidaseaktivität getestet werden.

Eine Nitrozellulose-Membran wurde luftblasenfrei auf eine Selektionsplatte von relativ frisch kotransformierten Hefezellen gedrückt und die Orientierung der Membran auf der Platte markiert. Die Membran wurde dann vorsichtig mit einer Pinzette abgenommen, für ca. zehn Sekunden in flüssigem Stickstoff getaucht und bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurde die Membran mit den Kolonien nach oben zeigend in eine Petrischale auf ein mit Z-Puffer und X-Gal Lösung (100 ml Z-Puffer, 1,67 ml X-Gal Stammlösung) getränkten Whatman-Papier aufgelegt und für ca. 8-16 Stunden bei 30°C inkubiert, bis blaue Kolonien auftraten. Positive Klone konnten durch den Vergleich von Membran und Selektionsplatte detektiert werden.

Z-Puffer	X-Gal Stammlösung
16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	100 mg/ml in
5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	N,N-Dimethylformamid
0,75 g KCl	
0,246 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	

⇒ auf einen Liter mit ddH₂O auffüllen und autoklavieren

2.2.5. Fluoreszenzmikroskopie

Für Analysen der Fluoreszenzversuche wurde mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP5 von Leica (Wetzlar, Deutschland) gearbeitet. Die anschließende Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Analysesoftware von Leica LAS AF Lite nach Herstellerangaben. Folgende Laser und Detektoren wurden dabei verwendet:

- Anregung von YFP und GFP: Argon Laser bei 488 nm
- Anregung des Mitotrackers[®]: Laser DPSS 561 (Diode-pumped solid-state continuous wave laser) bei 561 nm
- Als Detektoren wurden die HyD[™] Detektor von Leica verwendet. YFP wurde zwischen 500-550 nm und das Mitotracker Signal zwischen 600-613 nm detektiert.

- Chlorophyll wurde mit einem PMT (Photomultiplier Tubes) Detektor zwischen 650-750 nm detektiert

2.2.6. Bioinformatische Methoden

Tabelle 2.7. Folgende Programme wurde für die bioinformatischen Analysen verwendet

Name	Verwendung	Adresse
The Calmodulin Target Database (Yap et al. 2000)	Vorhersage von Calmodulin-Bindedomänen	http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/flash.htm
ARAMEMNON (Schwacke et al. 2003)	Topologie- und Expressionsanalysen von pflanzlichen Membranproteinen	http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de
Helical Wheel Applet	Helicale Darstellung von Calmodulin-Bindedomänen	www.camp.bicnirrh.res.in/helicalWheel/
MAFFT (Katho 2002, Katho 2005)	Darstellung von Sequenz-Alignments	http://mafft.cbrc.jp/alignment/server
MPIC (Murcha et al. , 2015)	Datenbank für Komponenten des Mitochondrialen Importapparates	www.plantenergy.uwa.edu.au/applications/mpic/

2.2.6.1. Erstellung von Sequenz-Alignments

Die Sequenzen, die für die Erstellung der Sequenz-Alignments stammen aus der MPIC-Datenbank (Murcha et al. 2015) und sind in der Tabelle 2.7 gelistet. Basierend auf diesen Sequenzen wurde mit MAFFT Alignments erstellt und dabei der Algorithmus MAFFT-L-INS-i mit der Scoring Matrix Blosum62 verwendet (Kato et al. 2002; 2005).

Tabelle 2.8. Liste der Aminosäuresequenzen, die für die bioinformatischen Analyse verwendet wurden. Die Sequenzen stammen aus der MPIC-Datenbank (Murcha et al. 2015)

Bezeichnung	Sequenz
At1g17530 atTim23.1	MAINRSSDHESDENTRLYPYQNYQVPIKSQYLYKLPTSPE FLFTEESLQRRSWGENTLFTYGTGYLAGSVAGASAGIFSGI KSFENGDTTKLKINRILNSSGQAGRTWGNRVGIVGLIYAGIE SGVVAVTDKDDVWTSVVAGLGTGAVFRAARGVRSAAVAGA FGGIAAGAVVAGKQVFKRYAHI

At1g72750 atTim23.2	MAANNRSDHGS DENTRLYNPYQNYEVPINKSQYLYKLPTSP EFLFTEEALRQRRSWGENLTFYTGTAYLGGSVAGASVGVIT GVKSFE S GDTTKLKINRILNSSGQTGR TWGNRIGIIGLVYAG IESGIVAATDRDDVWTSV VAGLGTGAVCRAARGVRSAAVAG ALGGLAAGAVVAGKQIVKRYVPI
At3g04800 atTim23.3	MADPMNHSTGHQQQKYRQYNPYQQVNLPYRKLYELPTS PEFLFEE EATKKRLTWGENLTFFTGWGYCTGSVLGAFKGTI AGMRAAERGESLKIRTNRILNSGGLVARRGGNCLG SVGLM FAAMESGV TYMRDGDGSLTTVIAGLATGVLYRAASGPRS AVVAGAVGGVAALAAVAGRRIVKRFVPI
YNR017W <i>S.cerevisiae</i> (sc)Tim23	MSWLF GDKTPTDDANA AVGGQDTTKPKELSLKQSLGFEPN INNIISGPGGMHVDTARLHPLAGLDKGVEYLDLEEEQLSSL EGSQGLIPSRGWTD D L C Y G T G A V Y L L G L G I G G F S G M M Q G L QNIPPNSPGKLQLNTVLNHITKRGPFLGNNAGILALSYNII NSTIDALRGKHDTAGSIGAGALTGALFKSSKGLKPMGYSS AMVAAACAVWCSVKRRLLEK
gi/5454122 <i>H.sapiens</i> Tim23	MEGGGGSGNKTTGGLAGFFGAGGAGYSHADLAGVPLTGM NPLSPYLNVDPRYLVQDTDEFILPTGANKTRGRFELAFFTI GGCCMTGA AFGAMNGLRLGLKETQNM AWSKPRNVQILN MVTRQGALWANTLGLSLALLYSAFGVII EKTRGAEDDLNT VAAGTMTGMLYKCTGGLRGIARGGLTGLTSLYALYNN WEHMKGSLLQQL
Phpat.011G020000.1 <i>P.patens</i> Tim23	MNDDRQDSQSGAVFGE EGQGGRLYN PYADLYGAADLKSL ESVYRLPSAPEYLFDEAVVQRRNWS ENLTYHTGCGYLAGA VGGGAKGALEGLRSQEGSDTMKIRVNRFLNASGHRGRAYG NTVGILGLMYAGFESTASHYRATDDMLNTVIAGLGTGVM YKAAAGPRTAAIAGALGGIAAAGLVAGKQLTKRYLPI
Carubv.10012124m.g <i>C.rubella</i> Tim23-Like1	MAELLFTEESLKQRRSWAENLTFYTGICYLDGSVASSTAGF FSGMRSFENGDTTKLKINRILNSSGQAGRTWGNRI GVVGLIYAGIESGVVAVK
Carubv.10016391m.g <i>C.rubella</i> Tim23-Like2	MADPMNPSTGDQQQKYRQYNPYQKINLPYRQIYELP TSPEFLFEE EATKKRLSWGENLTFFTGWGYLTGSLLGA AKGTIDGIRSAERGESLKIRTNRILNSGGLAARRSGNCL GSLGLMFAAMESGV TYLRDGDGSLTTVIAGLATGALYR AASGPRSAVVAGAVGGVTALAAVAGRRIVKRFVPI
Carubv.10020993m.g <i>C.rubella</i> Tim23-Like3	MAANNRSDHGS DENTRLYNPYQNYEVPINKSQYLYK LPTSPEFLFTEEALRQRRSWGENLTFYTGTAYLGGS VAGASLGVITGIKSFE S GDTTKLKINRILNSSGQTGR TWGNRVGIIGLVYAGIESGVVAGTDRDDVWTSV VAGLGT GAVCRAARGVRSAAVAGALGGLAAGAVVAGKQIVKRYVPI
GRMZM2G064600 <i>Z.mays</i> Tim23-Like1	MADPRLYPTESGSDDRRDAAYPGSERRLYN PYQDLNLP YRQLYDLPTSPEFLFQEEAVAQRRSWGENLTYYTG VGYLGGAGAGAALGLRDAARGAEPGEPAKIRANRVL NSCGSSGRRVGNTLGVI GLMYAGIESAMVAARDRDDW INSVAGLGTGALFRAANGPRSAVVAGAVGGVLAGA

	AAAAKQVGKRYLPAL
GRMZM2G077760 <i>Z.mays</i> Tim23-Like2	MADPRPYSTMYGTDDRRDAIPASASERRLYNPYQDLNMP YRQLYDLPTSPEFLFQEEAAAQRRSWGENLTYYTGVGYLGG AVAGATLGLRDAARGAEPGEPAKIRANRVLNCSGSSGRRV GNTLGVIGLMYAGIESAMVAARDRDDWINSVAAGLGTGAL FRAANGPRSAVVAGAVGGVLAGAAAAAKQVGKRYVPAL
GRMZM2G368041 <i>Z.mays</i> Tim23-Like3	MDDPRMFPSGSDDRSDAERRLYNPYQDLNMPYSYRTLY DLPTSPEFLFQEEALAQRSSWGENLTFYTGVGYL SGAVGGAVLGLRDAARGAEPGETAKIRANRVLNAC GSSGRRVGNTLGVIGLMYAGIESAMVAARDRDDWM NSVAAGLGTGTLFRAANGPRSAVAGALGGILAAA AAGGKQLAKRYVNVI

2.2.6.2. Berechnung der prozentualen Ähnlichkeit von atTim23.1, atTim23.2 und atTim23.3

Zur Bestimmung der prozentualen Übereinstimmung von atTim23.1, atTim23.2 und atTim23.3 wurde zunächst ein Alignment mit dem Programm MAFFT erstellt. Die übereinstimmenden Aminosäuren des zu untersuchenden Paares wurden anschließend gezählt und durch die Länge des kürzeren Proteins geteilt (McCormack and Braam 2003). Die erhaltende Zahl gibt Auskunft über die Ähnlichkeit der beiden Proteine zueinander.

3. Ergebnisse

Durch Konzentrationsänderung im Zytosol der Zelle ist Kalzium, als wichtigster sekundärer Botenstoff eukaryotischer Organismen, in der Lage während der Signaltransduktion äußere Reize in zelluläre Signale umzuwandeln (Berridge et al. 2000, Tianbao Yang 2003, Perochon et al. 2011). Diese Signale werden durch Kalziumsensoren aufgenommen und in zelluläre Antworten, wie zum Beispiel die Aktivierung oder Abschaltung von Signal-Kaskaden, transkriptionelle Regulationen oder regulatorische Prozesse, umgewandelt. Neuste Untersuchungen konnten die Beteiligungen von Organellen an dem Signalnetzwerk der Zelle durch Kalzium und Calmodulin, ein kalziumbindendes Protein, das durch Konformationsänderungen in der Lage ist mit Zielproteinen zu interagieren, aufzeigen (Stael et al. 2012). So wurde u.a. gezeigt, dass der Import kerncodierter Proteinen in die innere Membran oder in die Matrix von Mitochondrien Kalzium und Calmodulin abhängig ist. Diese Regulation findet innerhalb der TIM23/TIM22-Komplexe statt (Kuhn et al. 2009). Ziel dieser Arbeit war es Proteinkomponenten der beiden Komplexe, welche an der Kalzium/Calmodulin-Regulation des Importprozesses in Mitochondrien beteiligt sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

3.1. Kalziumregulation von atTim23.2

3.1.1. *In silico* Analysen der atTim23.2 Gensequenz

Eine Analyse der Proteinsequenzen auf mögliche Calmodulin-Bindestellen wurde mit Hilfe der „Calmodulin Target Database“ durchgeführt. Diese Datenbank ermöglicht es durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Calmodulin-bindenden Proteinen, potentielle Calmodulin-Bindedomänen (CaMBDs) zu identifizieren. Die charakteristischen Eigenschaften solcher CaMBD sind zu einem ihre Länge von ca. 20 Aminosäuren, ihre Hydrophobizität und ihre positive Nettoladung (O’Neil and DeGrado 1990). Des Weiteren bilden solche Domänen meistens eine amphiphile α -Helix aus (James et al. 1995). Zu den erfolgversprechendsten Kandidaten der Analyse der verschiedenen Komponenten der TIM23- und TIM22-Komplexe, zählt die Translokase der inneren Membran 23 (Tim23). Das Protein ist eine Komponente des Membrankanals TIM23 und verantwortlich für den Import der meisten Matrixproteine (Murcha et al. 2012). Die Analyse des Genoms von *A.thaliana* zeigt drei Homologe von Tim23, atTim23.1 und atTim23.2 befinden sich auf dem Chromosom 1 und atTim23.3, welches auf dem Chromosom 3 zu finden ist (Murcha et al. 2003). Obwohl alle Tim23 Proteine sehr ähnlich in ihrer Struktur sind, ist die Expression des atTim23.1 und des atTim23.2 Proteins am höchsten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass

atTim23.2 Teil des TIM17:23-Komplexes der inneren Membran ist (Wang et al. 2012). Daher wurden die folgenden Untersuchungen zunächst mit dem atTim23.2 Protein durchgeführt.

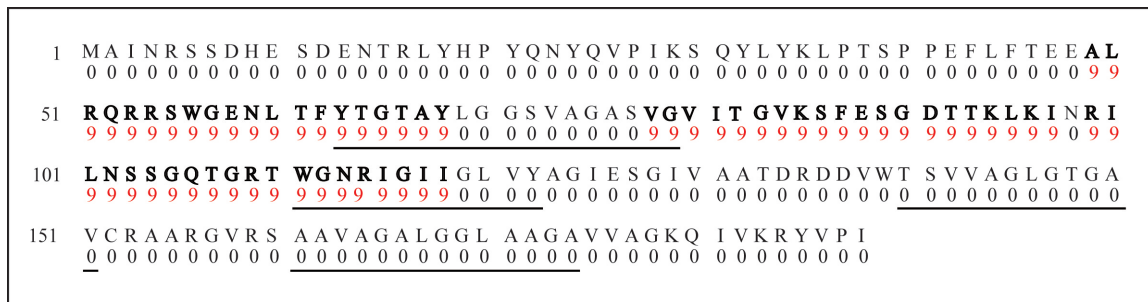


Abb. 3.1. Analyse potentieller CaMBDs in der Aminosäuresequenz von atTim23.2

Analyse der Sequenz von atTim23.2 auf potentielle CaMBDs mittels eines in der „Calmodulin Target Database“ implementierten Programms. Die Darstellung der normierten Zahlen (von 0 bis 9) unterhalb der Proteinsequenz basiert auf den Kriterien der Auswertung der Datenbank. Eine Reihe hoher Werte zeigt dabei die Lokalisierung einer möglichen CaMBD. Solche zeigen sich im N-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 49 bis 68 und in zwei Bereichen der ersten LOOP zwischen Aminosäure 78 und 97 sowie 99 und 118. Querstriche unterhalb der Sequenzen bezeichnen die Positionen der Transmembrandomänen.

Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse der Analyse potentieller CaMBDs für die Aminosäuresequenz des atTim23.2 Proteins, welche mittels der „Calmodulin Target Database“ erstellt wurden. Unterhalb der Sequenz sind Zahlen (von 0 bis 9) dargestellt. Basierend auf den Eigenschaften einer CaMBD kennzeichnet eine Folge von hohen Werten die mögliche Lokalisation einer solchen Domäne. Demzufolge konnten der Bereich zwischen den Aminosäuren 49 und 68, welcher in der N-terminalen Region des Proteins liegt, und die Bereich zwischen den Aminosäuren 78 und 97 sowie 99 und 118, welche in etwa der ersten LOOP entsprechen, als mögliche CaMBDs von atTim23.2 identifiziert werden (Abbildung 3.1). Da CaMBDs im Allgemeinen eine amphiphile Helix bilden, wurde zur weiteren Untersuchung das Programm „Helical Wheel Applet“ herangezogen. Für atTim23.2 konnte eine amphiphile α -Helix zwischen den Aminosäuren 49 und 66 des N-terminalen Bereiches modelliert werden (Abbildung 3.2, A). Drei positiv geladene und eine negativ geladenen Aminosäure ergeben dabei eine positive Nettoladung von +2. Auch im Bereich des LOOP 1, konnte zwischen den Aminosäuren 80 und 97 eine amphiphile α -Helix aufgezeigt werden. Drei positiv geladene und zwei negativ geladenen Aminosäure ergeben hier ebenfalls eine positive Nettoladung von +1 (Abbildung 3.2, B).

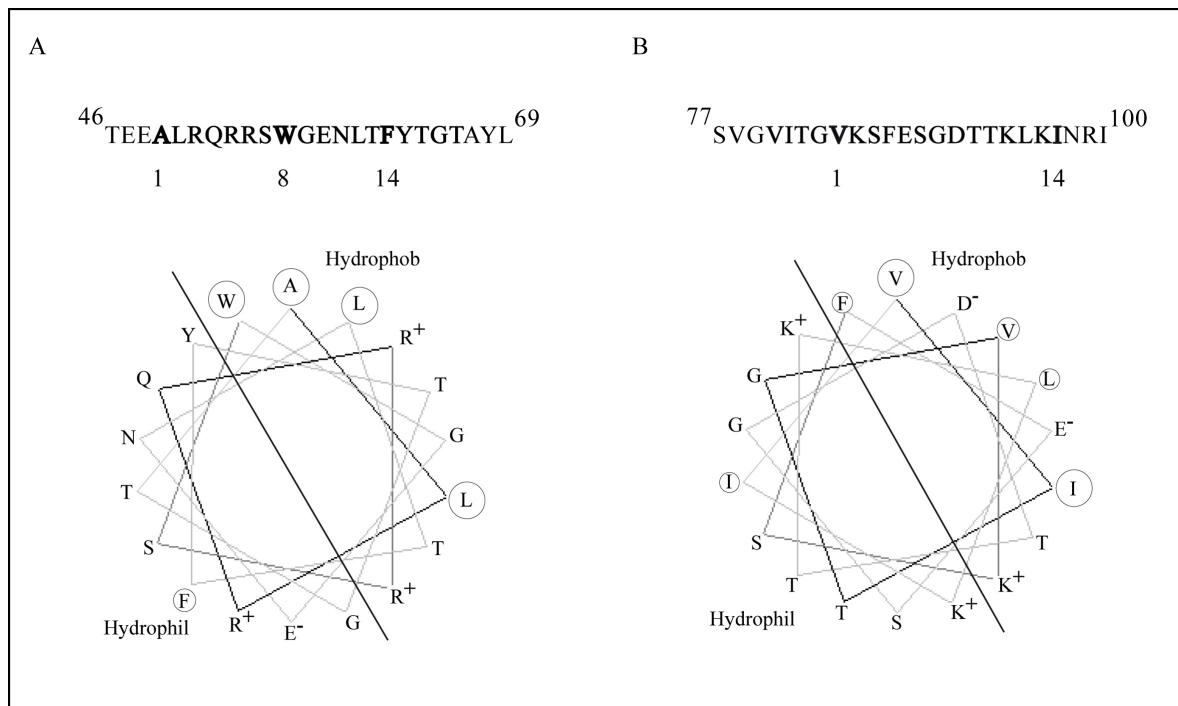


Abb. 3.2. Helical wheel Darstellung der CaMBDs von atTim23.2

Die Analyse der potentiellen CaMBDs wurde mit dem Programm Helical Wheel Applet durchgeführt. Darstellung der Sequenz von atTim23.2 zwischen der 46. und 69. AS (A) und der 77. und 100. AS (B). Hervorgehobene Bereiche entsprechen der darunter dargestellten modellierten amphiphilen α -Helix. Spezifische Calmodulin-binde Motive (1-10- bzw. 1-14-Motiv) sind unterhalb der Sequenzen dargestellt. Zirkel: hydrophobe AS; +: positiv geladenen AS; -: negativ geladene AS.

Vergleichsanalysen unterschiedlicher Calmodulin-bindender Proteine haben gezeigt, dass diese Domänen oftmals durch spezifische Motive gekennzeichnet sind (Rhoads and Friedberg 1997). Bei der kalziumabhängigen Bindung unterscheidet man u.a. das 1-10-Motiv mit der Unterklasse 1-5-10 und das 1-14-Motiv mit der Unterklasse 1-8-14 oder 1-5-8-14 (Quelle: Calmodulin Target Database). Des Weiteren sind auch die Motive 1-12 und 1-16 zu finden. Die Zahlen kennzeichnen dabei Positionen von konservierten, hydrophoben Aminosäuren. Solche Motive konnten in beiden potentiellen CaMBD von atTim23.2 identifiziert werden (Abbildung 3.2). Dabei handelt es sich im N-terminalen Bereich um ein 1-8-14-Motiv, während innerhalb des ersten LOOP ein 1-14-Motiv zu finden ist. Somit konnte weiter gezeigt werden, dass diese Bereiche von atTim23.2 die Voraussetzungen für eine CaMBD erfüllen.

3.1.2. Expression und Aufreinigung von atTim23.2

Für die erfolgreiche experimentelle Arbeit mit Proteinen ist es hilfreich, dass das zu charakterisierende Protein heterolog löslich exprimiert werden kann. Die lösliche Expression des Membranproteins atTim23.2, birgt im Vergleich zu löslichen Proteinen deutlich größere Schwierigkeiten. Durch die unterschiedlichen hydrophilen sowie hydrophoben Domänen die ihre Struktur aufweist, sind solche Proteine nach dem Herauslösen aus der Membran in polaren als auch in apolaren

Medien unlöslich. Nach Expression und Zellaufschluss liegen diese vor allem als Aggregat vor. Deshalb wurden unterschiedliche Methoden getestet, um große Mengen des Proteins in löslicher Form zu erzeugen um die Untersuchungen einer möglichen Calmodulin-Bindung von atTim23.2 weiter führen zu können.

Zunächst wurden gängige Methoden, wie die Aufreinigung des Proteins unter verschiedenen Bedingungen sowie unterschiedliche Expressionstemperaturen getestet. Weiterhin wurden diverse *E.coli*-Stämme für die Expression und unterschiedlicher Vektorsysteme verwendet. Die Löslichkeit des atTim23.2 Proteins ließ sich auf diese Weise jedoch nicht signifikant erhöhen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nach Methoden gesucht, welche speziell für Membranproteine entwickelt wurden. So wurde u.a. der Einbau des Proteins in Liposomen (Balsera et al. 2009), der Versuch einer Renaturierung von atTim23.2 (Pribil et al. 2010) und die Verwendung des „MembraneMaxTM Protein Expression Kit“ von Lifetechnologies, welches es ermöglicht Membranproteine mittels einer im Kit enthaltener Phospholipid-Membran löslich zu exprimieren (Katzen et al. 2008) getestet. Diese Methoden konnten die Löslichkeit des Proteins ebenfalls nicht erhöhen. Die Behandlung der aufgereinigten Proteine mit verschiedenen Detergenzien (Dodecyl- β -D-maltosid, Lithiumdodecylsulfat, Triton X-100) konnten das gewünschte Ziel außerdem nicht erreichen. Erst die Klonierung der atTim23.2 Gensequenz in das „pMALTM Protein Fusion and Purification System“ führte letztendlich zum Erfolg. Das 40 kDa große Maltose-bindende Protein (MBP) wird durch das *E.coli* K12 Gen codiert (Duplay et al. 1984). Durch die Fusion einer Gensequenz mit dieser Sequenz (MBP-tag) kann die Löslichkeit von Proteinen erhöht werden (Kapust and Waugh 1999). Nach der Expression des Volllänge Proteins pMal-atTim23.2 in *E.coli*, wurde dieses erfolgreich über Affinitätschromatographie an Amylose-Sepharose aufgereinigt. Um D-Maltose und 6-Aminohexansäure vom aufgereinigten Protein zu entfernen, wurde über Nacht in einem Liter 50 mM Hepes pH 7,5 und 100 mM NaCl dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden anschließend die unlöslichen Bestandteile (P) von den löslichen Bestandteilen (Ü) des Proteins getrennt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung. Das Protein konnte erfolgreich aufgereinigt werden (Abbildung 3.3, B (1)). Vergleicht man den Auftrag mit dem Durchlauf wird deutlich, dass das Protein an die Säule gebunden hat. Durch den folgenden Waschschritt wurde das Protein nicht von der Säule verdrängt, erst durch die Elution mit D-Maltose konnte es im Eluat detektiert werden. Nach der Dialyse und der Trennung der Probe in eine lösliche und unlösliche Fraktion, ist das Protein deutlich in der löslichen Fraktion zu erkennen (Abbildung 3.3, B (1), Spur Ü). Gleichzeitig können weitere Proteine detektiert werden, wie man im unteren Bereich des Geles in der Spur der Elution sehen kann. Es wird vermutet, dass dies Degradationen des pMal-atTim23-Proteins darstellen. Um dafür zu sorgen nicht nur ein lösliches, sondern auch sauberes Protein zu bekommen, wurde zusätzlich ein Streptavidin-tag an den C-terminalen Bereich der Vollängen Gensequenz von pMal-atTim23.2 kloniert (Abbildung 3.3, B (2)). Nach erfolgreicher Aufreinigung an Streptavidin-Sepharose und der anschließenden Dialyse, ist das atTim23-Protein wiederum in der löslichen Fraktion zu erkennen (Abbildung 3.3, B (2), Spur

Ü). Vergleicht man die Elutionen der Konstrukte miteinander, sind nach der Aufreinigung des pMal-atTim23.2-strep Proteins keine weiteren Proteine bzw. Verunreinigungen mehr sichtbar (Abbildung 3.3, B (1) und (2), Spur E). Somit konnte ein System gefunden werden, welches es ermöglicht das Membranprotein atTim23.2 in einer löslichen Form zu exprimieren und im Wesentlichen kontaminationsfrei aufzureinigen.

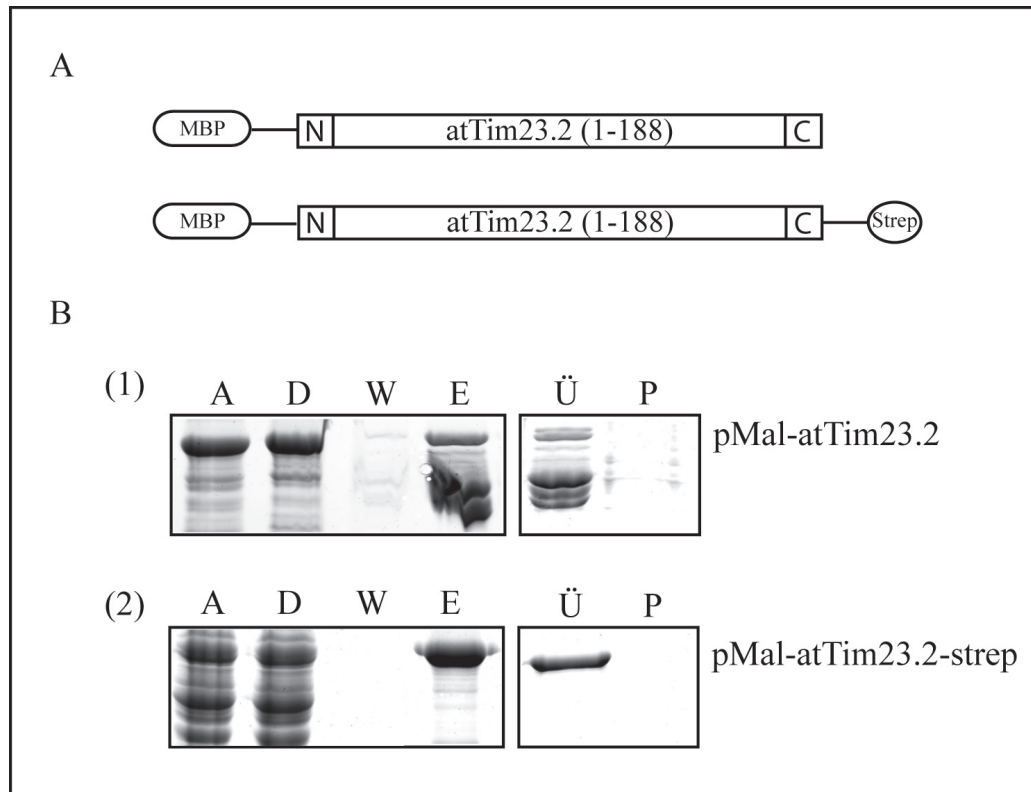


Abb. 3.3. Aufreinigung von atTim23.2 über Amylose- und Streptavidin-Sephrose

A: Grafische Darstellung des pMal-atTim23.2 bzw. pMal-atTim23.2-strep Konstruktes. Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektoren pMal-c eingebracht und somit N-Terminale mit dem MBP-tag fusioniert. Zusätzlich wurde in dem Konstrukt pMal-atTim23.2-strep ein Strep-tag am C-terminalen Ende der Gensequenz eingefügt. **B:** Nach der Expression des Volllängeproteins in *E.coli* wurde das Konstrukt pMal-atTim23.2 über Affinitätschromatographie an Amylose-Sephrose, das Konstrukt pMal-atTim23.2-strep über Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sephrose aufgereinigt. Das jeweilige Eluat wurde anschließend über Nacht dialysiert und in eine lösliche (Ü) und eine unlösliche (P) Fraktion geteilt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung. Ü: lösliche Fraktion; P: unlösliche Fraktion; A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch; E: Eluat

3.1.3. Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose

Die ausführliche Analyse der atTim23.2 Gensequenz hat zu der Annahme geführt, dass es sich hierbei um ein Calmodulin-bindendes Protein handeln könnte (siehe 3.1.1). Mit Hilfe der „Calmodulin Target Database“ konnten zwei putative CaMBDs identifiziert werden. Des Weiteren war es möglich, eine charakteristische amphiphile α -Helix für diese Bereiche zu modellieren. Im Folgenden sollte nun der experimentelle Beweis für das Vorhandensein einer solchen Domäne

erbracht werden. Eine gängige Methode um die Interaktion zwischen einem Protein und Calmodulin zu testen, ist der Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose (Wang et al. 2005). Hierfür wurde, nach erfolgreicher heterologer Expression, die Bakteriensuspension des Volllängeproteins atTim23.2 in An- und Abwesenheit von Kalzium mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach dem Waschen wurde kompetitiv mit einem Überschuss an exogenem Calmodulin eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung untersucht. Die Abbildung 3.4, B (1) zeigt den Pull-down Assay, welcher mit dem Volllängeprotein atTim23.2 in An- und Abwesenheit von Kalzium durchgeführt wurde. In dem Ansatz, in dem Kalzium enthalten war, konnte atTim23.2 im Eluat detektiert werden (Abbildung 3.4, B (1),links). War kein Kalzium im Ansatz enthalten, sondern EDTA und EGTA, konnte das Protein nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.4, B (1),rechts). Das 14 kDa Protein im Eluat der beiden Ansätze stellt das für die Elution verwendete exogene Calmodulin dar. Dies zeigt, dass atTim23.2 nur in Anwesenheit von Kalzium in der Lage ist, an das Calmodulin-Agarose zu binden und durch Zugabe von exogenem Calmodulin wieder freigesetzt werden kann. Für den Pull-down Assay wurde nicht das aufgereinigte Protein sondern das gesamte Bakterienlysates verwendet. Durch die heterologen Expression von pMal-atTim23.2-strep sind neben dem Protein auch verschiedene Proteine aus *E.coli* exprimiert worden. Diese sind deutlich im Auftrag des Assay zu erkennen (Abbildung 3.4, B (1), Spur A). Es bindet jedoch nur das atTim23.2 Protein an die Säule, die anderen Proteine sind im Durchlauf enthalten. Dies zeigt, dass es sich hierbei um eine spezifische Bindung von atTim23.2 an das Calmodulin handelt. Es sind keine unspezifischen Bindungen von Proteinen aus *E.coli* an das Säulenmaterial festzustellen.

Um die Spezifität der Calmodulin-Bindung von atTim23.2 zu zeigen, wurde eine weitere Komponente des TIM23-Komplexes, das atTim17.2 Protein, hinsichtlich einer möglichen Calmodulin Bindung untersucht. AtTim17.2 stellt, während des Proteinimportes in Mitochondrien, die Verbindung zwischen der inneren und der äußeren Membran her und gehört wie atTim23.2 zur Familie der PRAT-Proteine (Murcha et al. 2005). Nach erfolgreicher heterologen Expression, wurde die Bakteriensuspension von pMal-atTim17.2-strep in An- und Abwesenheit von Kalzium mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde anschließend kompetitiv mit einem Überschuss an exogenem Calmodulin eluiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Das Protein konnte trotz Anwesenheit von Kalzium und nach der Zugabe von exogenem Calmodulin nicht eluiert werden (Abbildung 3.4, B (2), links). Auch in dem Ansatz mit EDTA und EGTA konnte kein Protein im Eluat nachgewiesen werden (Abbildung 3.4, B (2), rechts). In diesem Experiment wurde ebenfalls das gesamte Bakterienlysate verwendet. Es traten keine unspezifischen Bindungen von Proteinen aus *E.coli* an das Säulenmaterial auf. Das Ergebnis zeigt, dass nicht alle Komponenten des TIM23-Komplexes und nicht alle Mitglieder der PRAT-Familie Calmodulin-bindende Eigenschaften aufweisen.

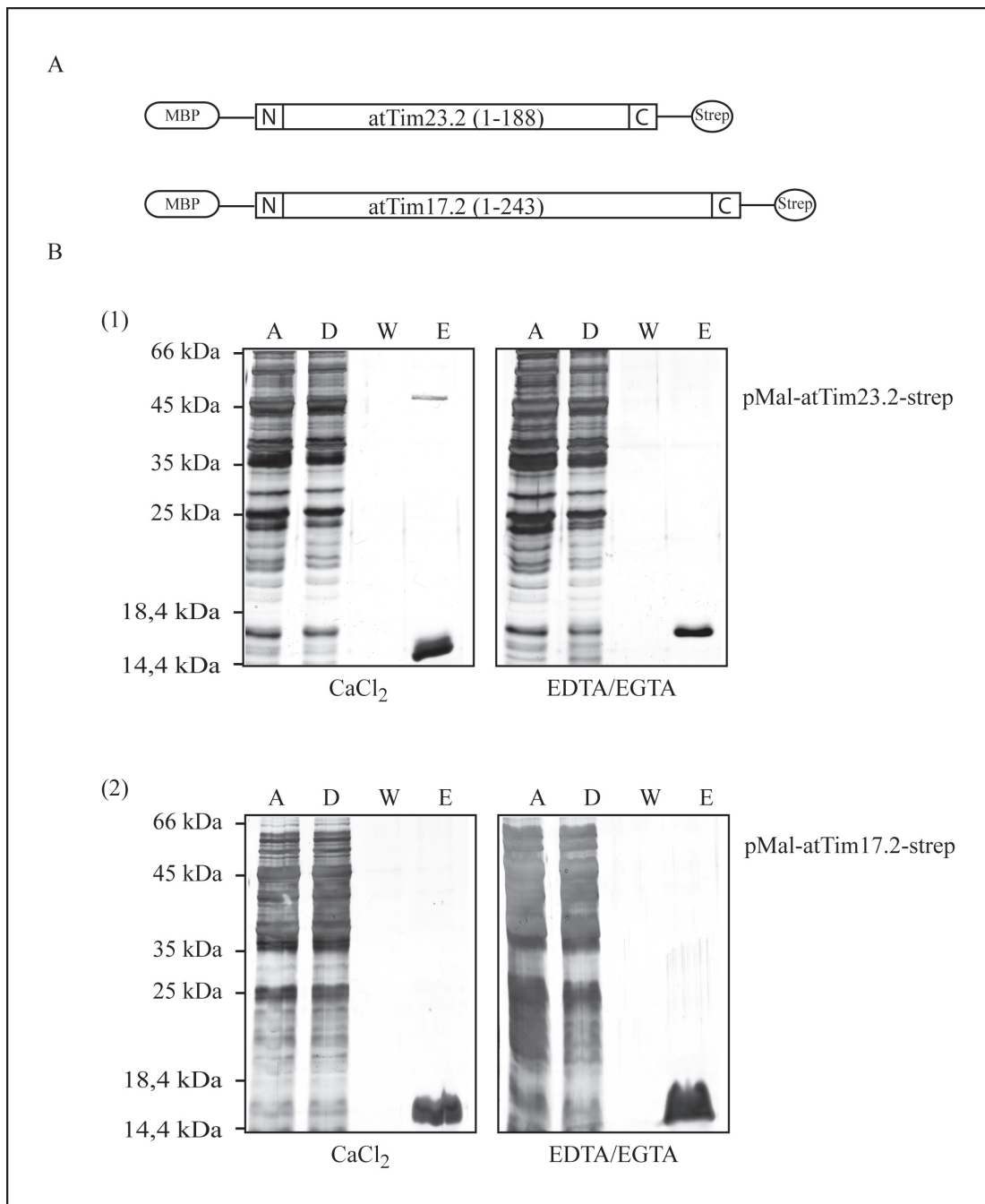


Abb. 3.4. Pull-down Assay von pMal-atTim23.2-strep und pMal-atTim17.2-strep an Calmodulin-Agarose

A: Graphische Darstellung der verwendeten Konstrukte pMal-atTim23.2-strep und pMal-atTim17.2-strep. Die Gensequenzen von atTim23.2 und atTim17.2 wurden in den Vektor pMal-c eingebracht und somit N-Terminal mit dem MBP-tag fusioniert. Zusätzlich wurde ein Strep-tag am C-terminalen Ende der Gensequenzen eingefügt.

B: Nach heterologen Expression wurde das gesamte Bakterienlysat von pMal-atTim23.2-strep (1) und pMal-atTim17.2-strep (2) in Anwesenheit und Abwesenheit von Kalzium mit Calmodulin Agarose inkubiert. Nach mehreren Waschschrten wurden die Proteine kompetitiv mit einem Überschuss von exogenem Calmodulin eluiert. Der Nachweis erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch; E: Elution.

Auf diese Weise kann nach *in silico* Untersuchungen nun auch experimentell belegt werden, dass es sich bei atTim23.2 um ein Protein handelt, welche *in vitro* Kalzium-abhängig mit Calmodulin interagieren kann.

3.1.4. Identifizierung der Calmodulin-Bindedomänen

Es konnte bereits durch Pull-down Assays an Calmodulin-Agarose gezeigt werden, dass es sich bei dem Volllängeprotein atTim23.2 um ein Calmodulin-bindendes Protein handelt. Nun sollen diejenigen Bereiche des Proteins identifiziert werden, die die Bindung an Calmodulin ermöglichen. Der Bereich zwischen den Aminosäuren 49 und 66, welcher dem N-Terminus des Proteins entspricht, und der Bereich zwischen den Aminosäuren 78 und 118, welcher die erste LOOP umfasst, wurden als mögliche CaMBDs identifiziert. Aufgrund dieser *in silico* Vorhersage der CaMBDs (siehe 3.1.1) wurden drei weitere Konstrukte des Proteins hergestellt. Den Angaben entsprechend wurde das Konstrukt pMal-atTim23.2 (1-70)-strep kloniert. Dieses setzt sich aus den Aminosäuren 1 bis 70 zusammen und beinhaltet somit den gesamten N-terminalen Bereich sowie einen kurzen Bereich der ersten Transmembran-domäne. Das zweite Konstrukt umfasst die Aminosäuren 80 bis 110 (pMal-atTim23.2 (80-110)-strep) und bildet den ersten Loop der Proteinsequenz. Des Weiteren wurde ein Konstrukt hergestellt, welches den LOOP2 (AS 120-140) entspricht und als pMal-atTim23.2 (120-140)-strep bezeichnet wird. Dieses Kontroll-Konstrukt soll zeigen, dass nur die vorhergesagten Bereiche von atTim23.2 an Calmodulin binden können. Alle Konstrukte tragen einen C-terminalen MBP-tag und N-terminalen Strep-tag. Nach der Expression der verkürzten atTim23.2-Konstrukte in *E.coli* und der erfolgreichen Aufreinigung, wurden diese über Nacht in einem Liter 50 mM Hepes pH 7,5 und 100 mM NaCl dialysiert, um die aufgereinigten Proteine von D-Maltose und 6-Aminohexansäure zu reinigen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden anschließend die unlöslichen Bestandteile (P) von den löslichen Bestandteilen (Ü) des Proteins getrennt und diese auf einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. Die Proteine konnten erfolgreich und in großen Mengen löslich exprimiert und aufgereinigt werden (Abbildung 3.5, B).

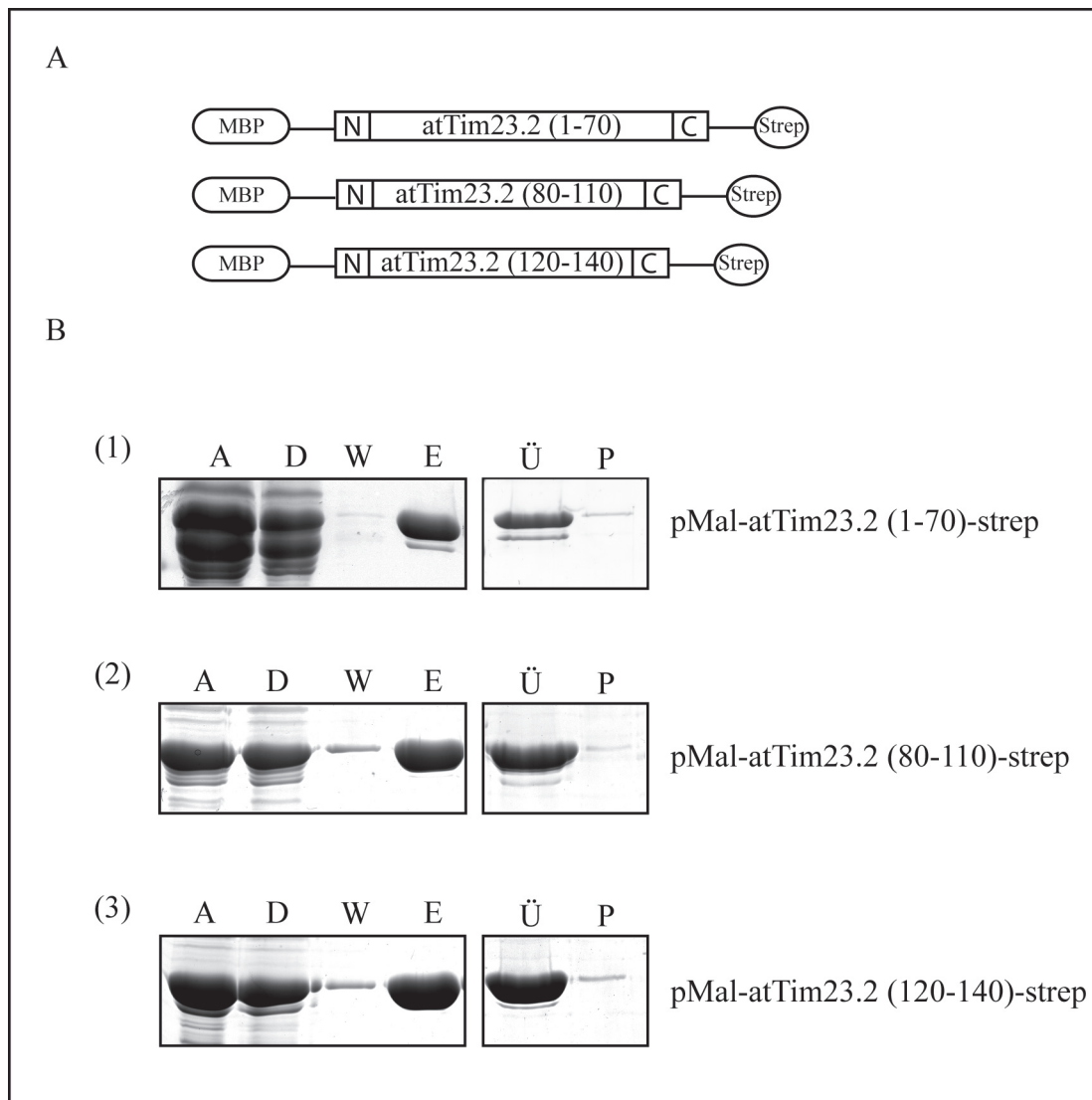


Abb. 3.5. Aufreinigung der verkürzten pMal-atTim23.2-strep Konstrukte an Streptavidin-Agar

A: Grafische Darstellung der pMal/strep Konstrukte. Die verkürzten Gensequenzen von atTim23.2 wurde in den Vektor pMal-c eingebracht und somit N-Terminal mit dem MBP-tag fusioniert. Zusätzlich wurde ein Strep-tag am C-terminalen Ende der Gensequenz eingefügt.

B: Nach erfolgreicher Expression der Konstrukte pMal-atTim23.2 (1-70)-strep (1), pMal-atTim23.2 (80-110)-strep (2) und pMal-atTim23.2 (120-140)-strep (3) in *E.coli* wurden diese über Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose aufgereinigt. Das Eluat wurde anschließend über Nacht dialysiert und in eine lösliche (Ü) und eine unlösliche (P) Fraktion geteilt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung. Ü: lösliche Fraktion; P: unlösliche Fraktion; A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch; E: Eluat

Nach heterologen Expression wurde mit dem gesamten Bakterienlysat von pMal-atTim23.2 (1-70)-strep (1), pMal-atTim23.2 (80-110)-strep (2) oder pMal-atTim23.2 (120-140)-strep (3) ein Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose durchgeführt (Abbildung 3.6, B). In An- bzw. Abwesenheit von Kalzium erfolgte wiederum die Inkubation mit Calmodulin-Agarose. Nach mehreren Waschschritten wurden die Proteine kompetitiv mit einem Überschuss an exogenem

Calmodulin eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. In dem Ansatz, in dem Kalzium enthalten war, konnte atTim23.2 (1-70) im Eluat detektiert werden, (Abbildung 3.6, B (1), links). Fehlte Kalzium im Ansatz, war kein Nachweis des Proteins möglich (Abbildung 3.6, B (1), rechts). Ein ähnliches Ergebnis ist bei atTim23.2 (80-110) zu sehen (Abbildung 3.6, B (2)). Hier wird ebenfalls eine kalziumabhängige Bindung an die Calmodulin-Agarose sichtbar. Ohne Kalzium im Ansatz konnte kein Protein in der Elutionsfraktion detektiert werden (Abbildung 3.6, B (2), rechts). Wurde der Pull-down Assay mit dem atTim23.2 (120-140) Konstrukt durchgeführt, konnte kein Protein in der Spur des Eluates nachgewiesen werden, ungeachtet dessen, ob Kalzium im Ansatz vorhanden war oder nicht (Abbildung 3.6, B (3)). Demnach sind die Konstrukte, atTim23.2 (1-70) und atTim23.2 (80-110), in der Lage kalziumabhängig an Calmodulin zu binden und stellen vermutlich die CaMBDs des Proteins dar. Der LOOP 2 (atTim23.2(120-140)) zeigt dagegen keine Calmodulin-Bindung. Diese Resultate stimmen mit den *in silico* Untersuchungen (siehe 3.1.1) der CaMBDs überein. atTim23.2 zeigt eine Topologie von vier Transmembrandomänen, wobei der C- und der N-terminale Teil des Proteins auf der Seite des Intermembranraumes (IMR) lokalisiert sind (siehe 3.3.2). Nimmt man Bezug auf die Topologie des Proteins zeigen die Ergebnisse im Weiteren, dass atTim23.2 mit Hilfe des N-terminalen Bereiches innerhalb des IMRs und mit dem LOOP 1 innerhalb der Matrix fähig ist, an Calmodulin zu binden.

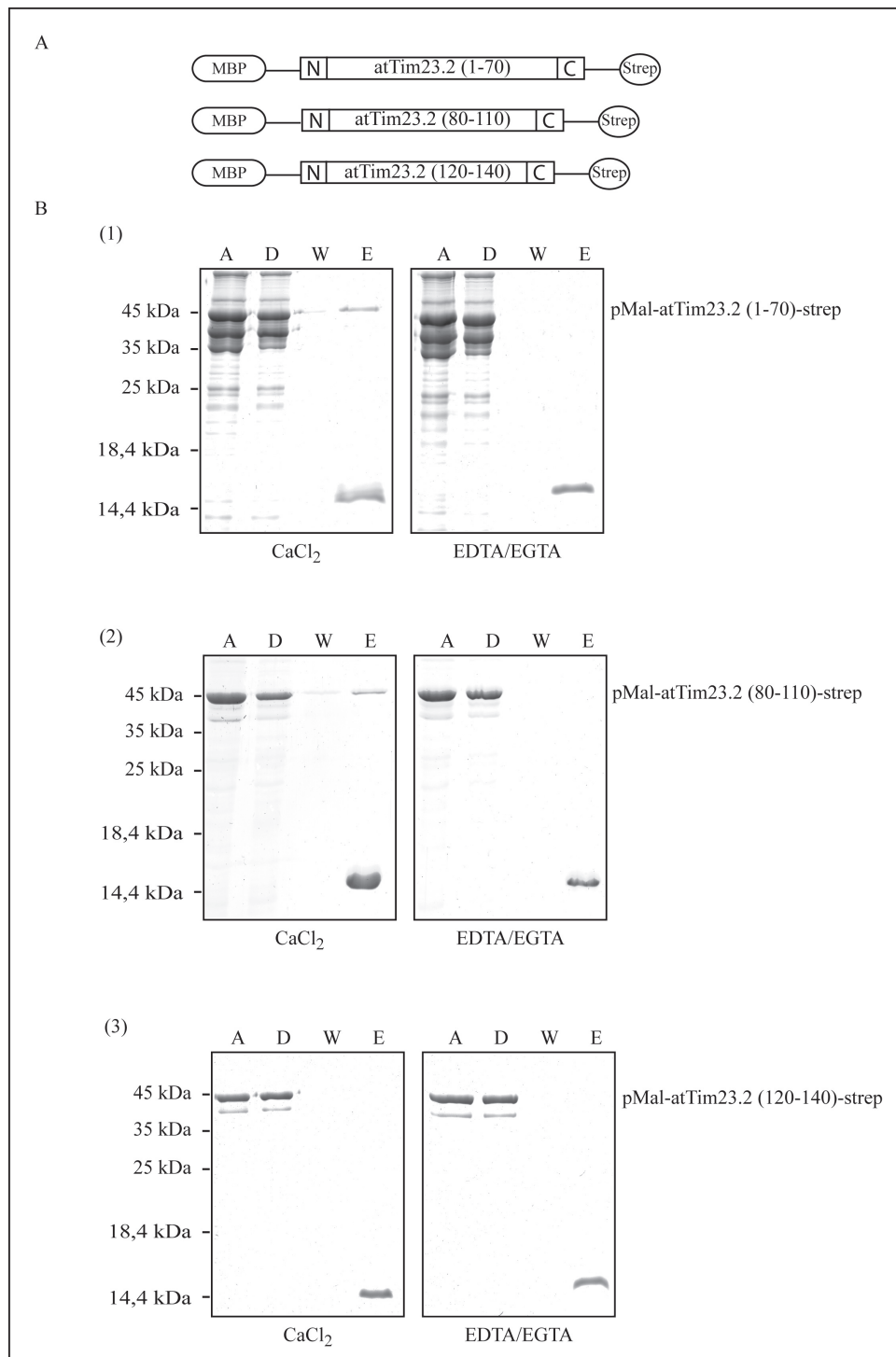


Abb. 3.6. Pull-Down Assay von atTim23.2 (1-70), atTim23.2 (80-110) und atTim23.2 (120-140) an Calmodulin Agarose

A: Graphische Darstellung der verwendeten Konstrukte pMal-atTim23.2 (1-70)-strep, pMal-atTim23.2 (80-110)-strep und pMal-atTim23.2 (120-140)-strep. Die verkürzte Gensequenz von atTim23.2 wurde in den Vektor pMal-c eingebracht und somit N-Terminal mit dem MBP-tag fusioniert. Zusätzlich wurde ein Strep-tag am C-terminalen Ende der Gensequenz eingefügt. **B:** Nach heterologen Expression wurde das gesamte Bakterienlysat von atTim23.2 (1-70) (1), atTim23.2 (80-110) (2), und atTim23.2 (120-140) (3) in Anwesenheit und Abwesenheit von Kalzium mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Proteine kompetitiv mit einem Überschuss von exogenem Calmodulin eluiert. Der Nachweis erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch; E: Elution

3.1.5. Quervernetzung von Tim23.2 (1-70), Tim23.2 (80-110) und Tim23.2 (120-140) mit EDC

Die chemische Quervernetzung zweier Proteine nach der Methode von Arazi stellt eine weitere Methode dar, um die kalziumabhängige Interaktion mit Calmodulin zu untersuchen. Um die bereits gezeigte Bindung von pMal-atTim23.2 (1-70)-strep und pMal-atTim23.2 (80-110)-strep mit Calmodulin zu bestätigen, wurden diese zunächst heterolog exprimiert und über Streptavidin-Agarose aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Dialyse der Eluate über Nacht, um das aufgereinigte Protein von D-Maltose und 6-Aminohexansäure zu reinigen. Die Proteine wurden am Folgetag mit käuflich erworbenen Calmodulin in Anwesenheit und Abwesenheit von Kalzium inkubiert. Mit dem 0Å Quervernetzungsgemisch aus EDC und S-NHS, welche kovalente Peptidbindungen zwischen Carboxylgruppen und Aminogruppen katalysieren (Staros et al. 1986), wurde ein Teil der Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der andere Teil blieb unbehandelt. Die Reaktion wurde mit SDS-Gelpuffer gestoppt und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Zur Kontrolle wurde das pMal-atTim23.2 (120-140)-strep Konstrukt verwendet, welches keine Interaktion mit Calmodulin zeigen sollte. Das Ergebnis des Quervernetzungsversuches von atTim23.2 (1-70) zeigt zunächst in allen Reaktionen eine dem Monomer entsprechenden Bande (Abbildung 3.7, B, Bild (1), Spur 3-8). Wurde Kalzium oder Kalzium und Calmodulin hinzugefügt, konnten ebenfalls nur eine Bande entsprechend der Größe eines Monomers detektiert werden (Abbildung 3.7, B, Bild (1), Spuren 3-4). Befand sich jedoch zusätzlich das Quervernetzungsreagenz EDC/S-NHS im Ansatz, taucht eine weitere Bande entsprechend der Größe eines Quervernetzungsproduktes aus atTim23.2 (1-70) und Calmodulin auf (Abbildung 3.7, B, Bild (1), Spur 5). Wurde das gleiche Experiment in Abwesenheit von Kalzium durchgeführt, konnten keine zusätzlichen Banden einem Quervernetzungsprodukt entsprechend detektiert werden (Abbildung 3.7, B, Bild (1) Spuren 6-8). Ähnliche Ergebnisse wurden in dem Versuch mit atTim23.2 (80-110) sichtbar (Abbildung 3.7, B, Bild (2)). Neben dem atTim23.2 (80-110) Protein ist eine deutliche Bande in der Spur zu sehen, in welcher das atTim23.2 (80-110) zusammen mit Calmodulin in Anwesenheit von Kalzium und dem Gemisch aus EDC/S-NHS inkubiert wurden (Abbildung 3.7, B, Bild (2), Spur 5). Diese Bande stellt das Quervernetzungsprodukt zwischen atTim23.2 (80-110) und Calmodulin dar. Fehlte EDC/S-NHS im Ansatz (Abbildung 3.7, B, Bild (2), Spur 4) wird keine zusätzliche Bande sichtbar. Wurde das gleiche Experiment in Anwesenheit von EGTA und EDTA durchgeführt, konnte kein Quervernetzungsprodukt zwischen dem Protein und Calmodulin aufgezeigt werden (Abbildung 3.7, B, Bild (2), Spuren 6-8). Wurde der Versuch zur Kontrolle mit dem atTim23.2 (120-140) Protein durchgeführt, konnte kein Quervernetzungsprodukt, weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Kalzium, detektiert werden (Abbildung 3.7, B, Bild (3), Spuren 1-8). Mit diesem Experiment wurde bestätigt, dass sowohl atTim23.2 (1-70) als auch atTim23.2 (80-110) zusammen mit Calmodulin nur in Anwesenheit von Kalzium interagieren können. Der Kontrollversuch mit atTim23.2 (120-140) zeigt im Weiteren, dass nicht alle Bereiche von atTim23.2 an Calmodulin

binden können und die Interaktion zwischen atTim23.2 (1-70) und atTim23.2 (80-110) mit Calmodulin spezifisch zu sein scheint. Diese Resultate unterstützen die Ergebnisse aus dem Pull-down Assay (siehe 3.1.3) und der *in silico* (siehe 3.1.1) Untersuchung.

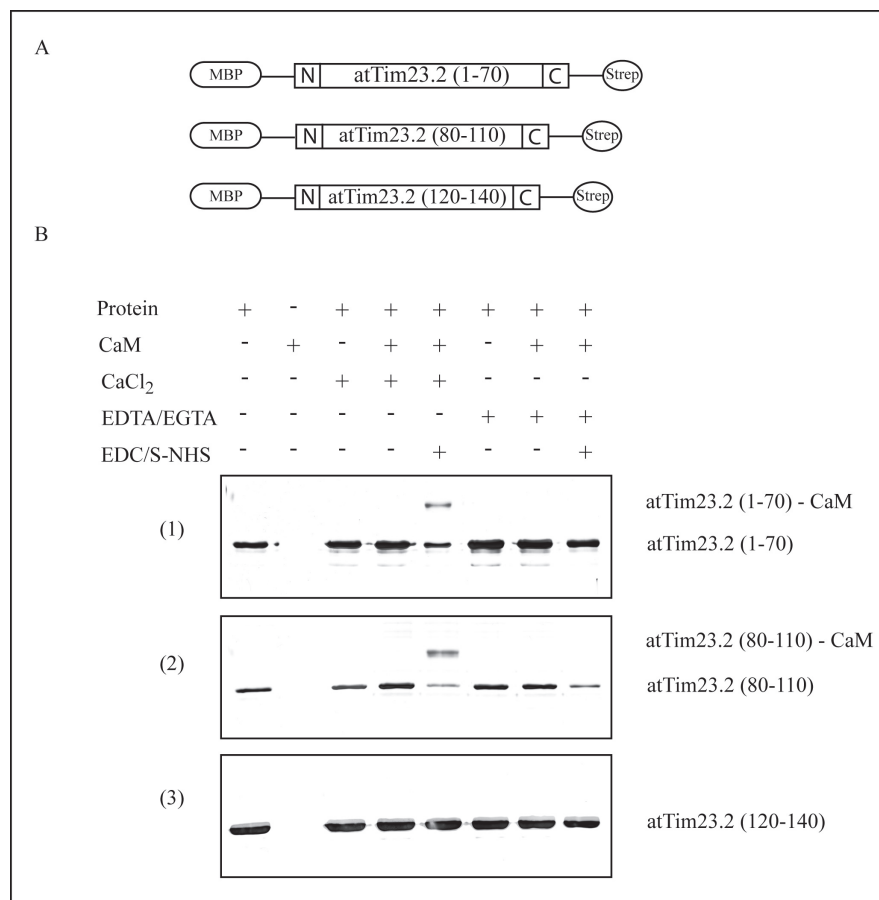


Abb. 3.7. Quervernetzung von atTim23.2 (1-70), atTim23.2 (80-110) und atTim23.2 (120-140) mit Calmodulin

A: Graphische Darstellung der verwendeten Konstrukte pMal-atTim23.2 (1-70)-strep, pMal-atTim23.2 (80-110)-strep und pMal-atTim23.2 (120-140)-strep. Die verkürzten Gensequenzen von atTim23.2 wurden in den Vektor pMal-c eingebracht und somit N-Terminal mit dem MBP-tag fusioniert. Zusätzlich wurde ein Strep-tag am C-terminalen Ende der Gensequenz eingefügt. **B:** Rekombinant exprimiertes pMal-atTim23.2 (1-70)-strep (1), pMal-atTim23.2 (80-110)-strep (2) bzw. pMal-atTim23.2 (120-140)-strep (3) Protein wurde in Anwesenheit (CaCl₂) und Abwesenheit von Kalzium (EDTA/EGTA) mit dem 0Å Quervernetzungsgemisch aus EDC und S-NHS (EDC/S-NHS) inkubiert. Nachdem die Reaktion mit SDS-Gelpuffer gestoppt wurde, erfolgte die Analyse der Proben über SDS-PAGE und Coomassiefärbung. CaM: Schweinegehirn-Calmodulin; atTim23.2 (x) – CaM: Komplex aus dem jeweiligen rekombinanten Protein und Calmodulin.

Überraschenderweise konnte eine Quervernetzung des Volllängeproteins pMal-atTim23.2-strep mit Calmodulin trotz verschiedener Versuche nicht detektiert werden. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie sollte daher untersucht werden, ob das Volllängeprotein eventuell ein Aggregat oder einen Komplex bildet, welche eine Quervernetzung verhindern würde. Zunächst wurde das rekombinante Volllängeprotein über Streptavidin-Sepharose aufgereinigt, über Nacht

dialysiert und am Folgetag in der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superdex 200 10/300 GL-Säule der Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennungskapazität der Säule umfasst Molekulargewichte von 1×10^4 – 6×10^5 Da. Ein Monomer von pMal-atTim23.2-strep sollte mit einer Größe von ca. 64 kDa bei einem Elutionsvolumen um 14 ml detektierbar sein. Das Chromatogramm zeigt jedoch ein Absorptions-Maxima bei einem Elutionsvolumina von etwa 8 ml (Abbildung 3.8, roter Graph). Im Vergleich mit Größenstandards (www.gelifesciences.com) entspricht dies der Größe eines Proteins/Komplexes von mehr als 700 kDa. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Protein trotz des MBP-tags aggregiert oder aber, sich zu einem Komplex zusammen lagert. Zur Kontrolle wurden die drei Konstrukte pMal-atTim23 (1-70)-strep, pMal-atTim23 (80-110)-strep und pMal-atTim23 (120-140)-strep ebenfalls analysiert. Gleichzeitig wurde der MBP-tag alleine untersucht. Zunächst wurden die in *E.coli* exprimierten verkürzten Konstrukte von atTim23.2 über Streptavidin-Sepharose aufgereinigt, über Nacht dialysiert und am Folgetag in der Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Das in *E.coli* exprimierte MBP wurde über Amylose-Sepharose aufgereinigt.

Das Elutionsprofil der analysierten Konstrukte zeigt, dass atTim23 (1-70) bei einem Volumen von etwa 14,8 ml eluiert (Abbildung 3.8, Graph Lila), während atTim23 (80-110) und atTim23 (120-140) ein Elutionsmaximum um 15 ml aufweisen (Abbildung 3.8, Graph Grün und Blau). MBP ließ sich in der Fraktion detektieren, die einem Elutionsvolumen von ca. 14,7 ml entsprach (Abbildung 3.8, grauer Graph, Zweiter Peak). Das Chromatogramm zeigt ein weiteres Absorptions-Maxima bei einem Elutionsvolumina von etwa 13 ml (Abbildung 3.8, Graph Grau, Erster Peak). Die drei verkürzten atTim23.2 Konstrukte eluieren also bei einem Volumen zwischen 14,8 ml und 15 ml, was im Vergleich mit Größenstandards (www.gelifesciences.com) den Größen von Monomeren entspricht. Da es sich in allen Fällen um lösliche Bereiche von atTim23.2 handelte, waren die Ergebnisse nicht überraschend. Als weitere Kontrolle wurde MBP allein untersucht. Im Vergleich mit Größenstandards entspricht das zweite Elutionsmaxima einer Größe von ca. 40 kDa. Ein zweiter Peak, der bei einem Volumen von etwa 13 ml auftaucht könnte der Größe nach einem Dimer des Proteins entsprechen.

Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass das Volllängeprotein pMal-atTim23.2-strep unter bestimmten Voraussetzungen aggregiert und sich somit zu einem hochmolekularen Komplex zusammenfügt. Diese Aggregation könnte verstärkt unter den Bedingungen der Quervernetzung auftreten und so die Unterschiede zur Calmodulin-Agarose Chromatographie erklären.

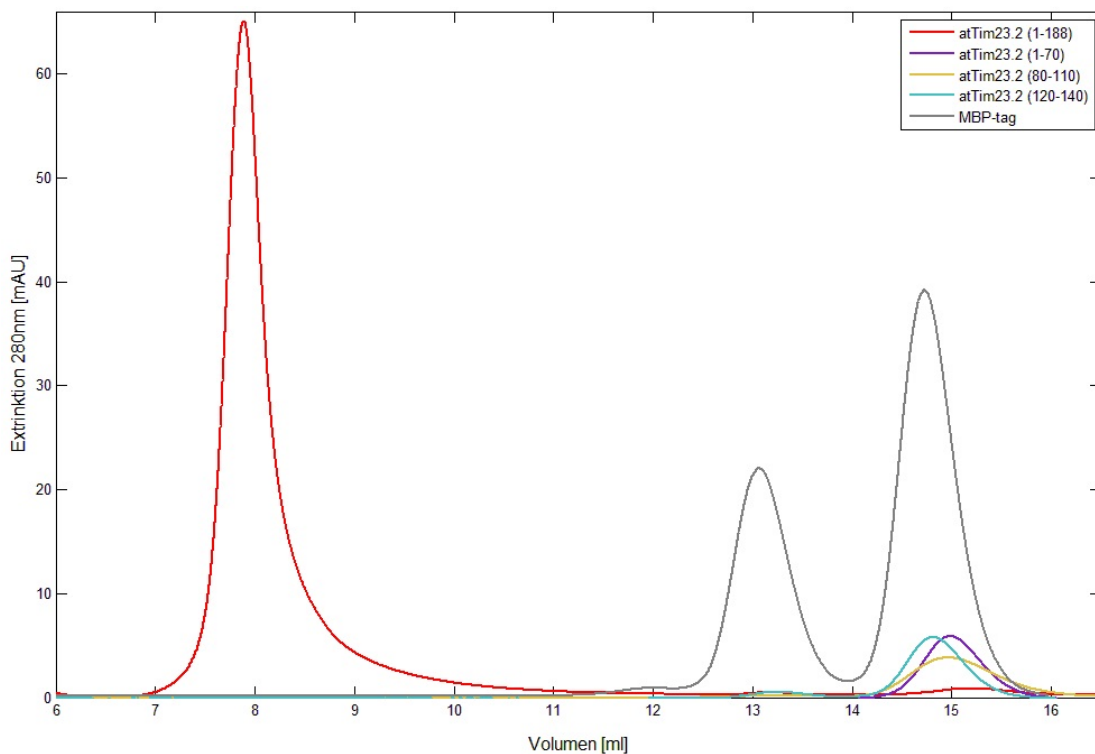


Abb. 3.8. Größenausschlusschromatographie von pMal-atTim23.2-strep und den verkürzten Konstrukten pMal-atTim23.2 (1-70)-strep, pMal-atTim23.2 (80-110)-strep und pMal-atTim23.2 (120-140)-strep mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule

Rekombinantes Volllängeprotein pMal-atTim23.2-strep (atTim23.2 (1-188)), und die verkürzten Konstrukte pMal-atTim23.2 (1-70)-strep (atTim23.2 (1-70)), pMal-atTim23.2 (80-110)-strep (atTim23.2 (80-110)) und pMal-atTim23.2 (120-140)-strep (atTim23.2 (120-140)) wurden über Streptavidin-Sepharose aufgereinigt und in einer Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superdex 200 10/300 GL-Säule der Größe nach aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde der MBP-tag allein untersucht. Die Abbildung zeigt das Chromatogramm der verwendeten Konstrukte, dabei wurde die UV-Absorption bei 280 nm (in mAU) gegenüber dem Elutionsvolumen (ml) aufgetragen.

3.1.6. Lokalisierung von CML30

Nachdem gezeigt wurde, dass Tim23.2 ein Calmodulin-bindendes Protein darstellt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, welches Calmodulin an dieser Interaktion beteiligt ist. Dabei stellt das in den Mitochondrien identifizierte Calmodulin-ähnliche Protein CML30 (Chigri et al. 2012) einen potentiellen Interaktionspartner für atTim23.2 dar. Zunächst wurde dazu die genaue Lokalisierung von CML30 in den Mitochondrien bestimmt. Hierfür wurde das „self assembly-GFP“-System (saGFP) verwendet (Gross et al. 2011). Das GFP wird hierbei in zwei unterschiedlich große Teile gespalten (saGFP₁₋₁₀ bzw. saGFP₁₁), welche, wenn sie sich in demselben zellularen Kompartiment befinden, fähig sind zu einem vollständigen GFP zu assemblieren. Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von CML30 wurden saGFP Fusionen mit Mia40 und der Präsequenz von OGDE1 (2-Oxo-glutarat-hydrogenase E1) eingesetzt. Mia40 ist im IMR der Mitochondrien lokalisiert; OGDE1 ist in der Matrix von Mitochondrien zu finden. Außerdem wurde das im Zytosol lokalisierte CAM4 (**Calmodulin 4**) verwendet. In der

Aminosäuresequenz von CML30 konnten drei Methionine detektiert werden. Um zu verhindern, dass die Methionine an Position 18 und 25 als alternativer Translationsstart fungieren, wurden diese durch Isoleucine ausgetauscht. Das entstandene Konstrukt atCML30 $_{\Delta M2/M3}$ wurde anschließend in binäre Vektoren kloniert, welche dieses C-Terminal mit saGFP $_{1-10}$ bzw. saGFP $_{11}$ fusionierten (Abbildung 3.9). Die Gensequenzen von Mia40, OGDE1 und CAM4 wurden dagegen ausschließlich C-Terminal mit dem saGFP $_{1-10}$ fusioniert. Alle Konstrukte wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und anschließend verschiedenen Kombinationen in einem 1:1 Gemisch in Blattmesophyllzellen von *Nicotiana benthamiana* infiltriert. Nach erfolgreicher transienter Expression, wurden aus den transformierten Blättern Protoplasten isoliert und anhand der in den Protoplasten beobachteten Fluoreszenzsignale die Lokalisierung des Proteins mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

Die Kotransformation von CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -saGFP $_{11}$ mit Mia40-saGFP $_{1-10}$ führte zu einer Assemblierung des GFP, was das Auftreten eines GFP-Signales verdeutlicht (Abbildung 3.10, A, Bild 1). Die punktuellen Strukturen des Signales überlagern sich fast perfekt mit dem Signal der mit Mitotracker[®] CMX Ros angefärbt Mitochondrien (Abbildung 3.10, A, Bild 1 und 2). Kein GFP-Signal konnte bei der Kontransformation von CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -saGFP $_{11}$ mit OGDE1-saGFP $_{1-10}$ detektiert werden (Abbildung 3.10, B, Bild 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass CML30 $_{\Delta M2/M3}$ anders als bisher angenommen im IMR der Mitochondrien und nicht in der Matrix lokalisiert ist (Abbildung 3.10, A und B, Bild 4). Die Kotransformation von CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -saGFP $_{11}$ mit dem CAM4-saGFP $_{1-10}$ führte ebenfalls nicht zum Auftreten eines GFP-Signales (Abbildung 3.10, C, Bild 1). Demzufolge verbleibt CML30 $_{\Delta M2/M3}$ weder im Zytosol noch gelangt CAM4-saGFP $_{1-10}$ unspezifisch in die Mitochondrien. Eine Fehllokalisierung oder Fehltransport der saGFP-Konstrukte in den Organellen kann demnach weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Funktionalität des Systems konnte durch die Kotransformation von CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -saGFP $_{11}$ mit dem CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -saGFP $_{1-10}$ Konstrukt bestätigt werden. Ein GFP-Signal konnte wie erwartet detektiert werden (Abbildung 3.10, D, Bild 1).

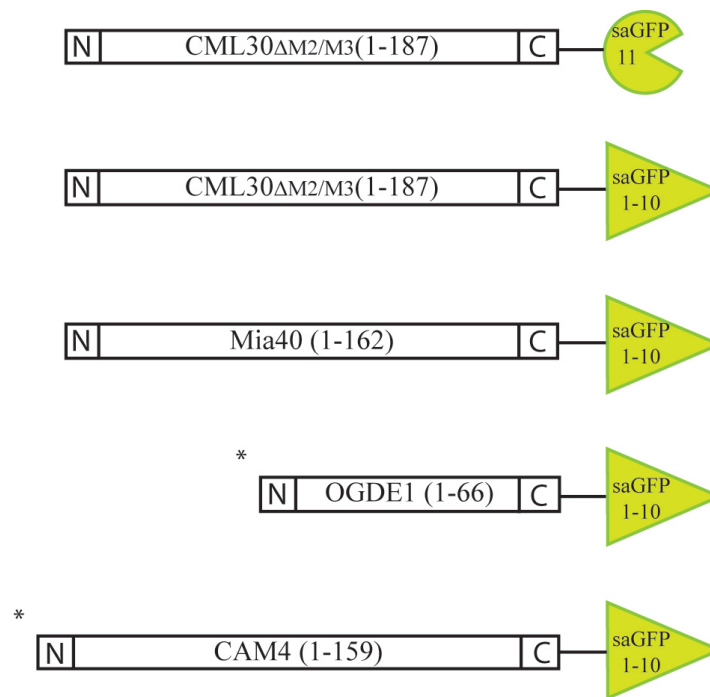


Abb. 3.9. Graphische Darstellung der im saGFP System verwendeten Fusionsproteine

Die veränderte Gensequenz von CML30 (CML30 Δ M2/M3) wurde in die Vektoren pBIN19saGFP_{11C} und pBIN19saGFP_{1-10C} eingebracht. Dabei wurde sie C-Terminal mit dem saGFP₁₋₁₀ oder dem saGFP₁₁ fusioniert. Die Gensequenz von Mia40, OGD E1 und CAM4 wurde in den Vektor pBIN19saGFP_{1-10C} eingebracht. Dabei wurden sie C-Terminal mit dem saGFP₁₋₁₀ fusioniert.

CML30 konnte den Ergebnissen der Lokalisationsstudie zur Folge im IMR der Mitochondrien detektiert werden. atTim23.2 weist zwei mögliche CaMBDs in diesem Bereich auf (siehe 3.1.1). Die N-Terminal identifizierte CaMBD befindet sich wie CML30 im IMR der Mitochondrien und könnte dementsprechend mit dem Protein interagieren.

Allerdings konnten Quervernetzungsexperimente sowie Pull-down Assays an Calmodulin Agarose eine Interaktion zwischen CML30 und atTim23.2 bisher nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Weitere Experimente müssen durchgeführt werden, um eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen aufzuzeigen.

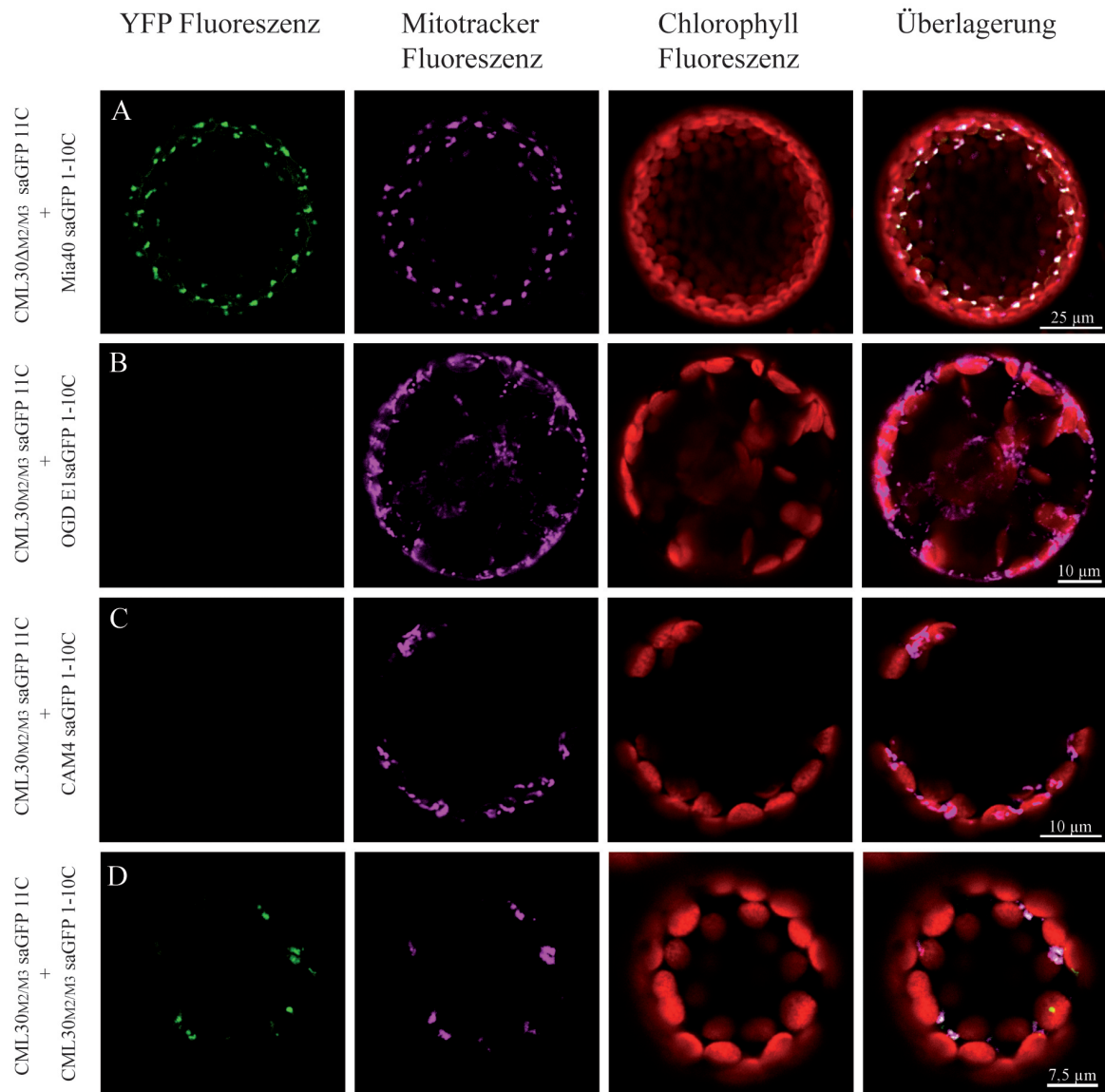


Abb. 3.10. Lokalisierung von CML30 in *N.benthamiana* Protoplasten

Blätter von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden mit unterschiedlichen pBIN19saGFP 1-10C und 11C Konstrukten ko-transformiert, exprimiert und aus den Blättern Protoplasten isoliert. Anschließend erfolgte zur Analyse der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Mitochondrien wurden mit Mitotracker® CMX Ros angefärbt. Die Funktionalität der saGFP-Konstrukte von Mia40, OGD E1 und CAM4 wurde unter 3.3.2 getestet und konnte gleichzeitig bestätigt werden. Erste Spalte: GFP Fluoreszenz der saGFP_{1-10C} und saGFP_{11C} Fusionsproteine. Zweite Spalte: Fluoreszenz des Mitotracker®. Dritte Spalte: Autofluoreszenz des Chlorophylls. Vierte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

3.1.7. Phylogenetische Untersuchungen der Calmodulin-Bindedomäne von atTim23.2

Die Analyse des Genoms von *A.thaliana* zeigt drei Homologe von TIM23, atTim23.1 (At1g17530), atTim23.2 (At1g72750) und atTim23.3 (At3g04800) (Murcha et al. 2003). Alle drei TIM23-Proteine umfassen 187 bzw. 188 Aminosäuren und gehören zur Familie der PRAT-Proteine

(Präprotein und Aminosäure Transporter). Des Weiteren sind sie sehr ähnlich in ihrer Struktur und zeigen eine hohe Übereinstimmung in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz untereinander. Eine Analyse der prozentualen Ähnlichkeit zwischen atTim23.1 und atTim23.2 zeigte eine Übereinstimmung von 83,95%. Zwischen atTim23.2 und atTim23.3 sowie atTim23.1 und atTim23.3 konnte eine Ähnlichkeit von 53,7% bzw. 51,5% aufgezeigt werden (McCormack and Braam 2003).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine solche Calmodulin-Bindestelle auch für atTim23.1 und atTim23.3 festgestellt werden kann. Die Analyse der Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe der „Calmodulin Target Database“, welche es ermöglicht durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Calmodulin-bindenden Proteinen, CaMBD zu identifizieren. Charakteristisch für solche CaMBD ist ihre Länge von ca. 20 Aminosäuren, ihre Hydrophobizität und ihre positive Nettoladung (O’Neil and DeGrado 1990). Die Ausbildung einer amphiphile α -Helix zählt ebenfalls zu ihren Merkmalen (James et al. 1995). Zur deren Analyse wurde das Programm „Helical Wheel Applet“ verwendet, mit dessen Hilfe amphiphile α -Helixies und deren Ladung modelliert werden können.

A.thaliana Tim23.1	48	SLKQRRSWGENTLFTYGTGYLAGSVAGASAGIFSG
A.thaliana Tim23.2	49	ALRQRRSWGENTLFTYGTAYLGGSVAGASVGVITG
A.thaliana Tim23.3	48	ATKKRLTWGENTLFTFTGWGYCTGSVLGAFKGTIAG
A.thaliana Tim23.1	83	IKSFENGDTTKLKINRILNSSGQAGRTWGNRVGIV
A.thaliana Tim23.2	84	VKSFESEGDTTKLKINRILNSSGQTGRTWGNRIIGII
A.thaliana Tim23.3	83	MRAAERGESLKIIRTNRIILNSGGLVARRGGNCLGSV

Abb. 3.11. Sequenzalignment potentieller CaMBDs von Tim23.1, Tim23.2 und Tim23.3 aus *Arabidopsis thaliana*.

Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm MAFFT nach Katoh erstellt (Katoh et al. 2002; 2005). Der Sequenzabgleich erfolgte zwischen den Proteine atTim23.1 (At1g17530), atTim23.2 (At1g72750) und atTim23.3 (At3g04800) für den Bereich der vorhergesagten CaMBD durch das Programm „Calmodulin Target Database“. Dunkelrot bezeichnet dabei eine hohe, hellrot eine niedrige Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser CaMBD. Schwarze Kästchen: identische Aminosäuren (AS); graue Kästchen: eine Konservierung durch chemisch ähnliche AS; Rot-Markierte Buchstaben: vorhergesagte CaMBD; Querstriche unterhalb der Sequenzen: Positionen der Transmembrandomänen

atTim23.1 zeigt wie atTim23.2 das Vorhandensein von zwei potentiellen CaMBDs (Abbildung 3.11). Diese befinden sich ebenfalls im N-terminalen Bereich sowie der ersten LOOP des Proteins. Die erste identifizierte CaMBD befindet sich dabei in beiden Tim Proteinen zwischen den Aminosäuren 50 und 68. Die zweite CaMBD von atTim23.1 überlappt mit der Bindedomäne von atTim23.2 nur zwischen Aminosäure 92 bis 110. Die Bereiche sind dabei hoch konserviert. Des Weiteren war es möglich amphiphile α -Helixies in den identifizierten Bereichen zu modellieren (Abbildung 3.12, A und B). Auch finden sich in diesen Bereichen bekannte Calmodulin-Bindemotive wieder (Rhoads and Friedberg 1997). So konnte ein 1-14-Motiv am N-Terminus und ein 1-12-Motiv in der ersten LOOP von atTim23.1 identifiziert werden (Abbildung 3.12, A und B). Somit erfüllen die potentiellen CaMBDs von atTim23.1 alle Eigenschaften

einer solchen Domäne. Im Gegensatz dazu, konnte für atTim23.3 eine potentielle CaMBD einzig in der ersten LOOP detektiert werden. Mit einer Länge weit unter 20 Aminosäuren, entspricht diese allerdings nicht den typischen CaMBDs. Die Ausbildung einer amphiphilen α -Helix konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Somit wird angenommen, dass atTim23.3 über keine bioinformatisch nachweisbare CaMBD verfügt und daher wohl kein Calmodulin-bindendes Protein darstellt. Die Proteine atTim23.1 und atTim23.2 scheinen nach den Ergebnissen der *in silico* Untersuchungen hingegen Calmodulin-bindende Proteine darzustellen. Der experimentelle Nachweis für atTim23.2 konnte bereits erbracht werden (siehe 3.1.3), die Bestätigung für eine Calmodulin-Bindung von atTim23.1 muss jedoch noch experimentell belegt werden.

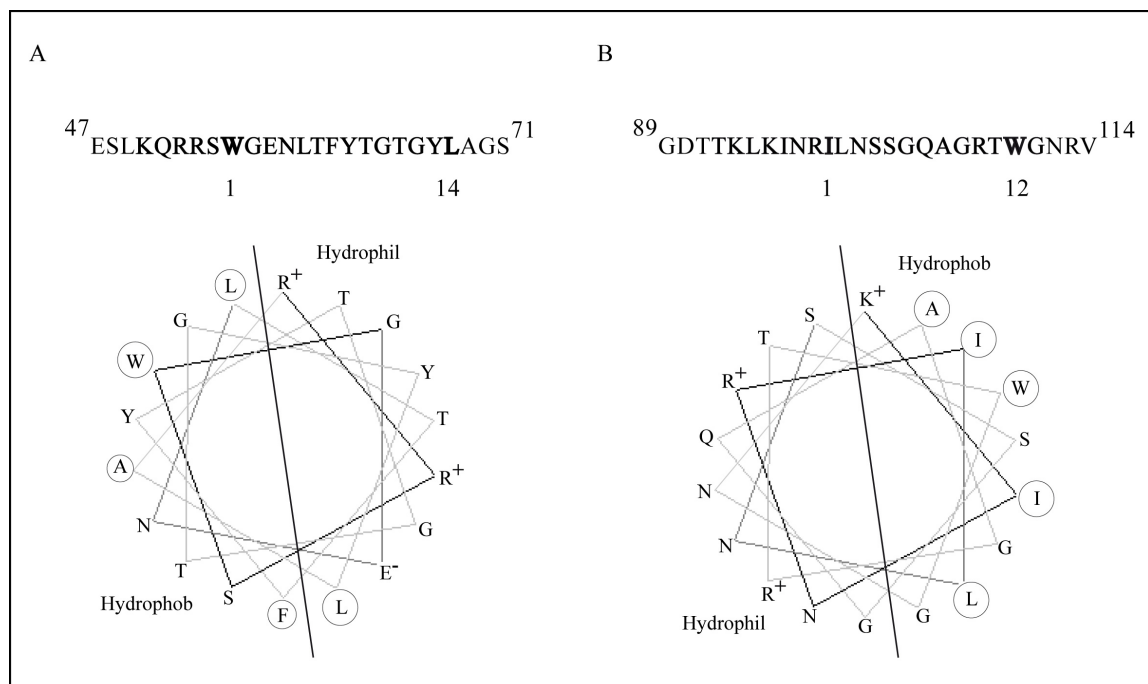


Abb. 3.12. Analyse der CaMBD von atTim23.1

Die Analyse der CaMBDs wurde mit dem Programm Helical Wheel Applet durchgeführt. Darstellung der Sequenz von atTim23.1 zwischen AS 47 und AS 71 (A) und AS 89 und AS 114 (B). Hervorgehobene Bereiche entsprechen einer modellierten amphiphilen α -Helix. Das spezifische Calmodulin-Motiv 1-14 bzw. 1-12 ist unterhalb der Sequenzen dargestellt. AS: Aminosäuren; Mit Zirkel gekennzeichnete Aminosäuren: hydrophobe AS; +: positiv geladenen AS; -: negativ geladene AS

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Eigenschaft der Calmodulin-Bindung spezifisch für Tim23.2 und Tim23.1 aus *Arabidopsis thaliana* ist oder ob sie auch für andere Pflanzen und nicht-pflanzliche Organismen gezeigt werden kann. Hierfür wurden wiederum *in silico* Untersuchungen und Sequenzvergleiche mit pflanzlichen und nicht-pflanzlichen Tim23 Orthologen durchgeführt. Zur Identifizierung von potentiellen CaMBDs wurde wiederum die „Calmodulin Target Database“ verwendet. Die Analyse der pflanzlichen Orthologen schloss Organismen aus dem Bereich der Samenpflanzen (*Capsella rubella* [Dicotylen], *Zea mays* [Monocotylen]), sowie der Moose (*Physcomitrella patens*) und der Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*) ein.

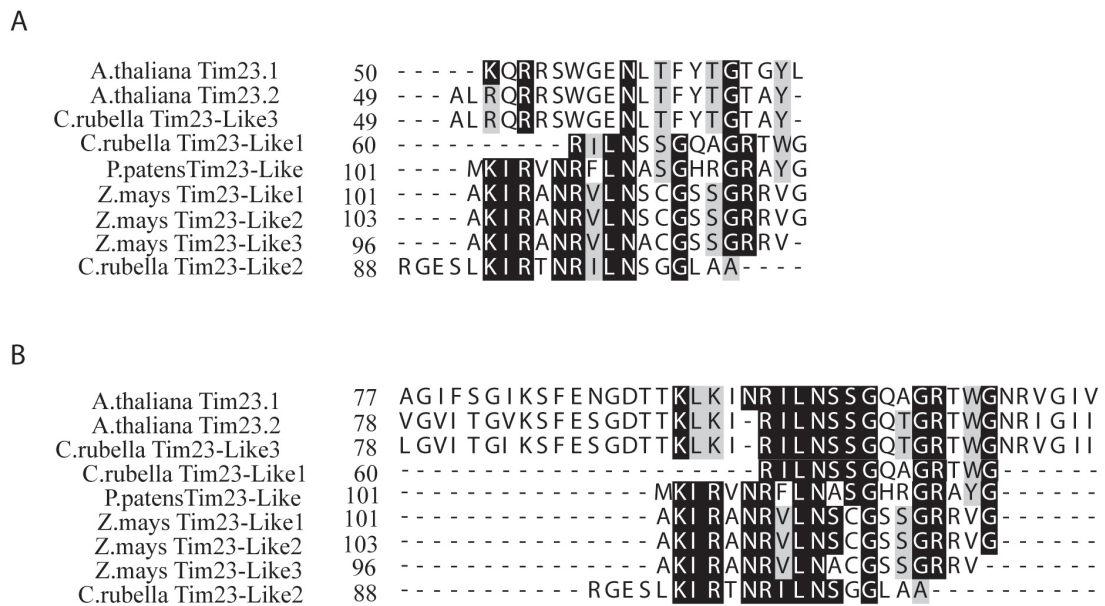


Abb. 3.13. Sequenzalignment potentieller CaMBDs von Tim23 aus *A.thaliana* mit pflanzlichen Organismen

Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm MAFFT nach Katoh erstellt (Katoh et al. 2002; 2005). Der Sequenzabgleich erfolgte zwischen den vorhergesagten CaMBDs A) im N-terminale Bereich und B) in der LOOP1 von Tim23.1 und Tim23.2 aus *A.thaliana* mit den potentiellen CaMBDs pflanzlicher Orthologen von *C.rubella*, *P.patens* und *Z.mays*. Schwarze Kästchen: identische Aminosäuren (AS); graue Kästchen: eine Konservierung durch chemisch ähnliche AS; Querstriche: Kennzeichnung von Positionen, an denen vom Programm für ein bestmögliches Alignment Leerstellen in die Sequenzen eingefügt wurden.

In fast allen untersuchten pflanzlichen Orthologen konnten potentielle CaMBD identifiziert werden (Abbildung 3.13). Die Konservierung zwischen den CaMBD aus *Arabidopsis* und den hier untersuchenden Spezies, vor allem im Bereich der ersten LOOP, ist dabei hoch (Abbildung 3.13, B). Sie finden sich in allen drei Tim23 Paralogen aus *Zea mays*, allerdings nur in 2 der Paralogen aus *Capsella rubella*.

Der Vergleich zu nicht-pflanzlichen Paralogen von atTim23 schloss Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Säuger (*Homo sapiens*) ein. Obwohl sich die Proteine strukturell sehr ähneln, konnte ein Sequenzvergleich mit atTim23.2 und Tim23.1 für die detektierten Bindestellen so gut wie keine Homologien aufzeigen (Abbildung 3.14).

Sequenzkonservierung der CaMBDs scheint den Untersuchungen entsprechend daher wohl nicht auf *Arabidopsis thaliana* beschränkt, jedoch kennzeichnend für Pflanzen zu sein.

A.thaliana Tim23.1 N	50	- - - KQRRSWGE - NL - - - TFYTGTGYL - -
A.thaliana Tim23.2 N	49	- ALRQRRSWGE - NL - - - TFYTGTAY - - -
S.cerevisiae Tim23	130	LPTGANKTRGRFEL - - - - - AFFTI - - - - -
H.sapiens Tim23	62	- - - - - GKLQLNTVLNHI TKRGPFLG

A.thaliana Tim23.1 L	77	AGIFSGIKSFENGDTTKLKI - NRILNSSGQAGRTWGNRVGIV
A.thaliana Tim23.2 L	78	VGVITGVKSFESGDTTKLKI - RILNSSGQTGRTWGNRI GII
S.cerevisiae Tim23	130	- - - - - GKLQLNTVLNHI TKRGPFLG - - - - -
H.sapiens Tim23	62	- - - - - LPTGAN - - KTRGRFELAFFTI -

Abb. 3.14. Sequenzalignment potentieller CaMBDs von Tim23 aus *A.thaliana* mit nicht-pflanzlichen Organismen

Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm MAFFT nach Katoh erstellt (Katoh et al. 2002; 2005). Der Sequenzabgleich erfolgte zwischen den vorhergesagten CaMBDs (N: N-terminale Bereich; L: LOOP1) von Tim23.1 und Tim23.2 aus *A.thaliana* mit den potentiellen CaMBDs nicht-pflanzlicher Organismen (*S.cerevisiae* und *H.sapiens*). Schwarze Kästchen: identische Aminosäuren (AS); graue Kästchen: eine Konservierung durch chemisch ähnliche AS; Querstriche: Kennzeichnung von Positionen, an denen vom Programm für ein bestmögliches Alignment Leerstellen in die Sequenzen eingefügt wurden.

3.2. Untersuchung der Dimerisierung von atTim23.2 mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems

Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* haben ergeben, dass scTim23 in der Lage ist, ein Dimer innerhalb der inneren mitochondrialen Membran zu bilden (Bauer et al. 1996). Die Dimerisierung erfolgt über ein hepta-Leucin-Zipper Motiv, welches in der zweiten Hälfte der hydrophilen N-terminalen Domäne von scTim23 lokalisiert ist. Hepta-Leucin-Zipper Motive bestehen in der Regel aus 4-5 konservierten Leucin-Resten, die in regelmäßigen Abständen von 7 Aminosäuren angeordnet sind (van Heeckeren et al. 1992). scTim23 ist die Poren-bildende Komponente des TIM23-Komplexes und das Öffnen und Schließen der Pore wird vermutlich über die Dimerisierung des Proteins gesteuert (Bauer et al. 1996). Da viele Mechanismen des Proteinimportes, welche in Hefe entdeckt wurden, auch in Pflanzen identifiziert werden konnten, sollte im Folgenden geklärt werden, ob die TIM23 Dimerisierung ein hefespezifisches Merkmal darstellt oder gleichermaßen bei Tim23.2 aus *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden kann.

3.2.1. Das Split-Ubiquitin-System

Zur Analyse der Interaktion von atTim23.2 mit sich selbst wurde das Split-Ubiquitin-System verwendet. Es ist ein auf Hefe basierendes genetisches Screening System, mit dessen Hilfe Protein-Protein Interaktionen zwischen Membranproteinen gewissermaßen in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden können. Die Interaktion findet direkt an der zellulären Membran statt und die Proteine müssen nicht wie im klassischen Yeast-Two-Hybrid System im Zellkern vorliegen (Stagljar et al. 1998). Es basiert auf der Rekonstitution von Ubiquitin, das in eine N-terminale Hälfte (Nub) und eine C-terminale Hälfte (Cub) gespalten werden kann (Abbildung

3.15). Cub und Nub haben eine hohe Affinität zueinander. Um dieses System für Protein-Interaktionsstudien verwendet zu können, wurde ein Isoleucin des Nub-Fragments an Position drei (NubI) durch Glycin (NubG) ausgetauscht und somit die hohe Affinität zwischen den Fragmenten aufgehoben (Johnsson and Varshavsky 1994).

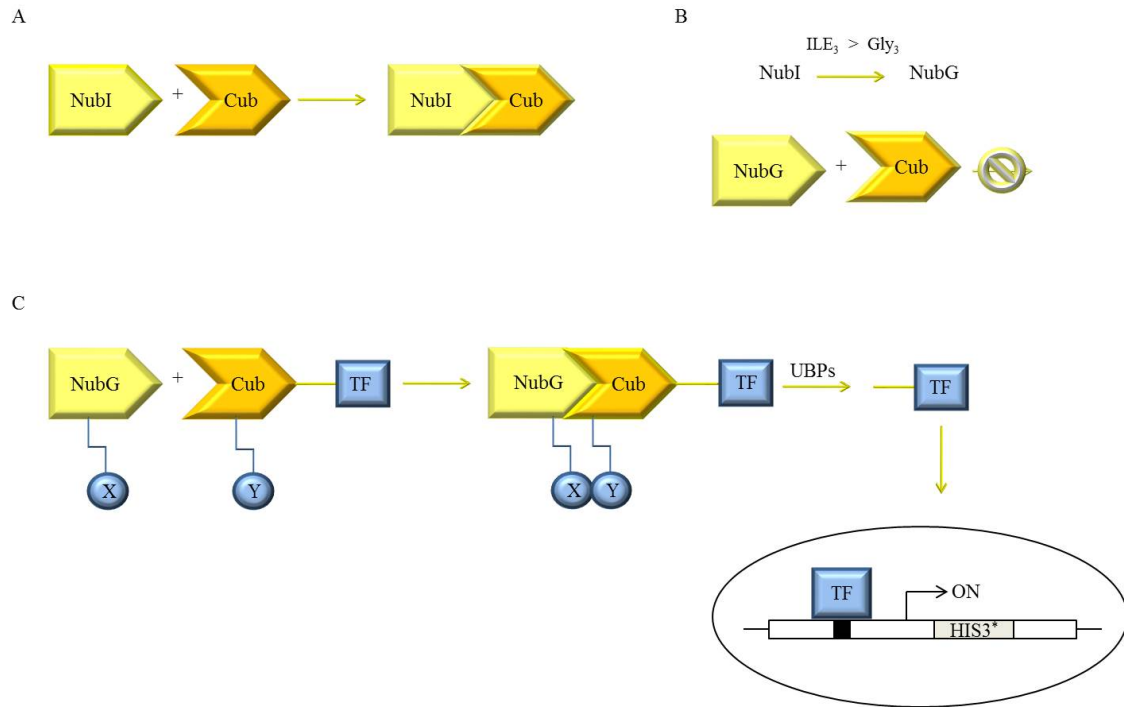


Abb. 3.15. Das Split-Ubiquitin System

A: Ubiquitin kann in eine N-terminale Hälfte (NubI) und eine C-terminale Hälfte (Cub) gespalten werden. Beide Teile des Ubiquitin haben eine hohe Affinität zueinander und assemblieren spontan zum vollständigen Ubiquitin. **B:** Durch eine Punktmutation im NubI Fragment (Isoleucin 3 > Glycin 3) entsteht das NubG Fragment. Die hohe Affinität der beiden Konstrukte kann dadurch aufgehoben werden und das System somit für Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden. **C:** Ein Protein Y (Köderprotein oder „bait“) kann mit dem Cub Fragment und einem künstlich erzeugten TF fusioniert werden. Ein Protein X (Beuteprotein oder „prey“) wird mit dem NubG Fragment des Ubiquitin fusioniert. Eine Interaktion zwischen Protein X und Y bringt NubG und Cub in räumliche Nähe zueinander, so dass sie sich zu einem vollständigen Ubiquitin assemblieren können. Dieses wird von einer Ubiquitin spezifischen Protease (UBPs) erkannt und der TF wird abgespalten. Der Transkriptionsfaktor gelangt anschließend in den Zellkern und kann verschiedene Reportergene, wie z.B. das HIS3 Reportergen, aktivieren. *: In dem hier verwendeten System werden zwei auxotrophe Marker, welche für Histidin (HIS3) und Adenin (ADE2) kodieren, aktiviert, sowie der chromogene Marker lacZ, der für das Enzym β -Galaktosidase kodiert.

3.2.2. Konstruktion des Bait-Vectors

Das zu untersuchende Membranprotein (Köderprotein oder „bait“) wird beim Split-Ubiquitin System mit der C-terminale Hälfte des Ubiquitin (Cub) und dem künstlich erzeugten Transkriptionsfaktor LexA-VP16 fusioniert. Ein zweites Protein (Beuteprotein oder „prey“) wird mit der mutierten Form der N-terminale Hälfte (NubG) fusioniert. Werden beide Fragmente im selben

Zellkompartiment exprimiert und interagieren miteinander, können NubG und Cub ein aktives Ubiquitin bilden. Dieses wird von einer UBPs (**U**biquitin spezifischen **P**rotease) erkannt, die das LexA-VP16 Protein abspaltet, welches in den Zellkern wandert. Durch die Bindung an den LexA Operator wird die Transkription von Reportergenen, zwei auxotrophe Marker welche für Histidin (HIS3) und Adenin (ADE2) kodieren, aktiviert (Stagljar et al. 1998). Die Interaktion der zu untersuchten Proteine führt demzufolge zum Wachstum der Hefe auf Minimalmedium ohne Histidin und Adenin.

Eine Grundlegende Voraussetzung für die Funktionalität des Systems, ist die Lokalisierung der Cub und NubG Fragmente im Zytosol der Hefen. Dies ist wichtig, vor allem bei Membranproteinen, deren Enden eventuell auf unterschiedlichen Membranseiten lokalisiert sind. Die Wahl der bait-Vektoren sollte deshalb mit Bedacht erfolgen. Für die nachfolgenden Experimente wurden der Vektor pBT3-C, welcher die Gensequenz von atTim23.2 C-Terminal mit dem Cub-Fragment fusioniert, und der Vektor pBT3-N, welcher die Gensequenz von atTim23.2 N-Terminal mit dem Cub-Fragment fusionierte, verwendet (Abbildung 3.16). Des Weiteren wurde der Vektor pBT3-SUC eingesetzt. Dieser Vektor fusioniert die zu untersuchende Gensequenz zusätzlich zum Cub-Fragment mit einer abspaltbaren N-terminalen Hefe-Signal-Sequenz der SUC2 Invertase. Diese soll den Einbau der zu untersuchenden Membranproteine in die Zytoplasmamembran der Hefen erleichtern. Da es sich bei atTim23.2 um ein Membranprotein mit vier Transmembrandomänen handelt und die SUC-Signal-Sequenz bei dem Einbau von Proteinen in die Hefemembran behilflich ist, wurden die folgenden Experimente hauptsächlich mit dem pBT3-atTim23.2-SUC Konstrukt als „bait“ durchgeführt.

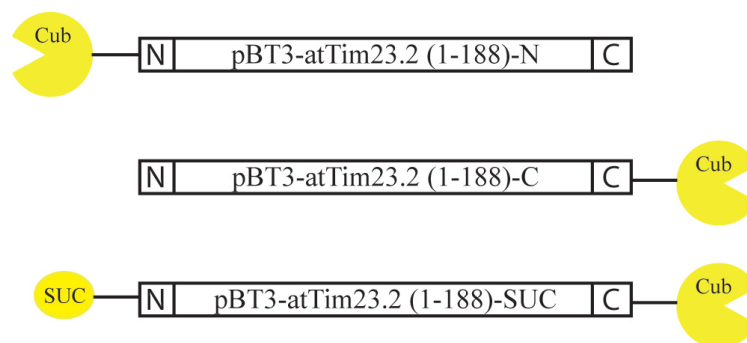


Abb. 3.16. Graphische Darstellung der pBT3-atTim23.2-N, pBT3-atTim23.2-C und pBT3-atTim23.2-SUC bait-Konstrukte.

Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektoren pBT3-N/C/SUC eingebracht und somit C-Terminal mit dem Cub-Fragment des Ubiquistins fusioniert. Zusätzlich wurde das Konstrukt pBT3-atTim23.2-SUC N-terminalen mit der SUC Signalsequenz fusioniert.

Die korrekte Expression des bait-Proteins in der Hefe wurde anschließend mit einem Kontrollassay analysiert. Hierfür wurden in die Hefezellen des Stammes NMY51 das atTim23.2 Proteine als Köderprotein („bait“) zusammen mit einem positiven (AI-Alg5) sowie einem negativen (DL-Alg5) Kontrollvektor als Beuteprotein („prey“) ko-transformiert. Das Konstrukt pPR3-AI-Alg5-C

exprimiert ein Fusionskonstrukt des Proteins Alg5, ein aus dem Endoplasmatischen Retikulum stammendes Hefeprotein, mit der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins NubI, wohingegen das pPR3-DL-Alg5-C Konstrukt das mutierte NubG Fragment des Ubiquitins enthält. Anschließend wurden die Hefezellen zur Analyse auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten (ohne Leucin und Tryptophan) und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten (ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) aufgebracht. Wachstum auf den SD-Leu/Trp Platten in beiden Ansätzen (Abbildung 3.17, B, 1.Reihe, Bild 1 und 2) zeigt, dass die Kotransformation erfolgreich war. Bei der Kotransformation von pBT3-atTim23.2-SUC zusammen mit der positiven Kontrolle konnte zusätzlich ein Kolonienwachstum auf den SD-Leu/Trp/His/Ala Platten gezeigt werden (Abbildung 3.17, B, 2.Reihe, Bild 2), das bei der Kotransformation mit dem negativen Kontrollvektor nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 3.17, B, 2.Reihe, Bild 1). Dieses Ergebnis zeigt, dass es zu einer Insertion des bait-Konstrukts in die Hefemembran gekommen war, welche das Cub-LexA-VP16 im Zytosol der Hefen lokalisiert. Darüber hinaus war eine Rekonstruktion des Ubiquitin von „bait“ und „prey“ nur mit nicht mutiertem NubI zu sehen, was die Funktionalität des Konstrukts in diesem System bestätigt. Eine Autoaktivierung des pBT3-atTim23.2-SUC Konstrukts konnte durch Kotransformation mit einem „leeren“ Vektor, der kein Protein sondern nur den N-terminalen Teil des Ubiquitins (NubG) exprimierte, ausgeschlossen werden. Die Kotransformation führte zwar zu einem Wachstum von Hefekolonien auf der Transformationsplatte SD-Leu/Trp, aber zu keinem Wachstum auf der Interaktionsplatte SD-Leu/Trp/His/Ala (Abbildung 3.17, B, 3.Spalte). Neben den Wachstumsfaktoren HIS3 und ADE2 trägt der Hefestamm NMY51 den chromogenen Marker lacZ, der für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Hefezellen, welche das Enzym exprimieren, werden blau wenn sie mit dem Substrat X-Gal inkubiert werden. Die Blaufärbung durch β -Galaktosidase kann in einem Filter Lift Assay untersucht werden. In Abbildung 3.17 C ist das Ergebnis des Assays für die Kotransformation von atTim23.2 mit dem positiven Vektor dargestellt. Die deutliche Blaufärbung bestätigt das Ergebnis des Wachstumsassays.

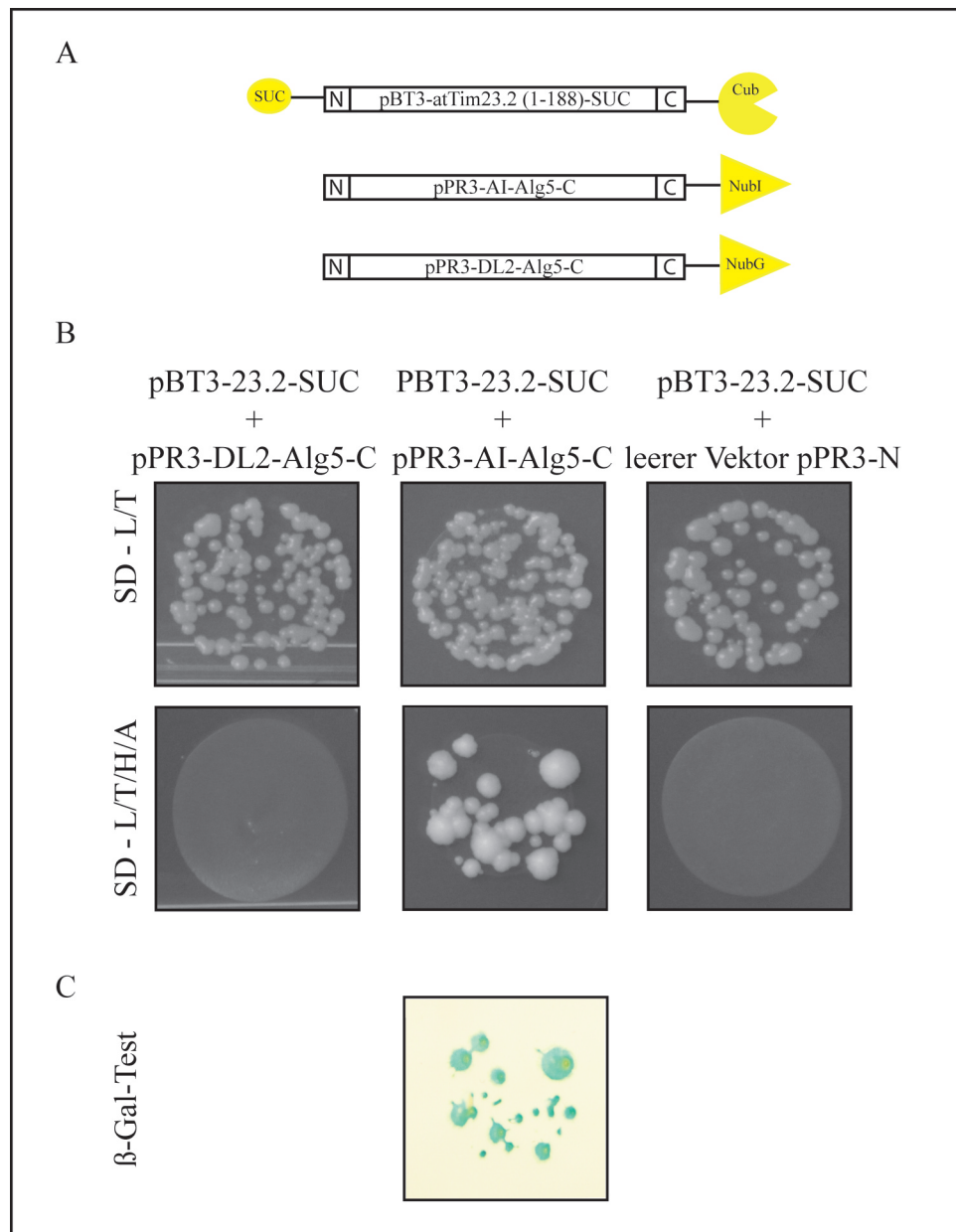


Abb. 3.17. Wachstum der transformierten Hefe auf Selektionsplatten im Kontrollassay

A: Graphische Darstellung des pBT3-atTim23.2 -SUC bait-Konstruktes und den positiven sowie negativen Kontrollvektoren pPR3-AI-Alg5-C und pPR3-DL-Alg5-C als prey-Konstrukte. Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektor pBT3-SUC eingebracht und somit C-Terminal mit dem Cub-Fragment des Ubiquitins fusioniert und zusätzlich N-Terminal mit der SUC Signalsequenz. Der Vektor pPR3-C fusioniert die Gensequenz von Alg5 C-Terminal mit dem NubI Fragment des Ubiquitin im Falle des negativen Vektors und mit dem NubI Fragment des Ubiquitin im Falle des positiven Vektors. **B:** Die Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit dem pBT3-atTim23.2-SUC Proteine als „bait“ zusammen mit einem positiven Kontrollvektor pPR3-AI-Alg5-C sowie dem negativen Kontrollvektor pPR3-DL-Alg5-C als „prey“ Protein ko-transformiert. Kompetente Hefezellen wurden dafür mit ein bis zwei μg der zu untersuchenden Plasmid-DNA und 300 μl LiPEG gemischt, inkubiert und nach Zugabe von DMSO, ein Hitzeschock durchgeführt. Die Selbstaktivierung des bait-Konstrukts wurde mit einem Vektor der keinen Teil des Ubiquitins exprimierte getestet (pBT3-atTim23.2-SUC + leerer Vektor pPR3-N). Anschließend wurden die Hefezellen zur Analyse auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten (ohne Leucin und Tryptophan) und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten (ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) gespottet. **C:** Das Ergebnis der Kotransformation von pBT3-atTim23.2-SUC mit dem positiven Vektor wurden mit einem β -Galaktosidase Filter Lift Assay bestätigt (β -Gal-Test).

Die prinzipielle Funktionalität des Split-Ubiquitin-Systems für das Membranprotein atTim23.2 konnte somit nachgewiesen werden. Im Weiteren soll nun eine mögliche Interaktion des Proteins mit sich selbst untersucht werden.

3.2.3. Dimerisierung von atTim23.2

Um eine mögliche Dimerisierung von atTim23.2 zu untersuchen wurde die Gensequenz des Proteins zusätzlich in den prey-Vektor eingebracht. Hierfür stehen die prey-Vektoren pPR3-N, pPR3-C und pPR3-SUC zur Verfügung. Für die Analyse der Dimerisierung von atTim23.2 wurden alle drei Vektoren getestet. Der Vektor pPR3-C fusioniert die Gensequenz von atTim23.2 C-Terminal und der Vektor pPR3-N fusioniert sie N-Terminal mit dem NubG-Fragment. Im pPR3-SUC Vektor befindet sich wiederum die abspaltbare N-terminalen Hefe-Signal-Sequenz SUC (Abbildung 3.18). Es wurden zunächst wiederum zur Kontrolle alle Fusionskonstrukte einzeln transformiert. Anschließend wurden die Hefezellen zur Analyse auf Selektionsplatten ohne Tryptophan (SD-Trp) aufgebracht. Ein Wachstum von Hefekolonien konnte auf allen Platten beobachtet werden und so die Effizienz der Transformation bestätigt werden.

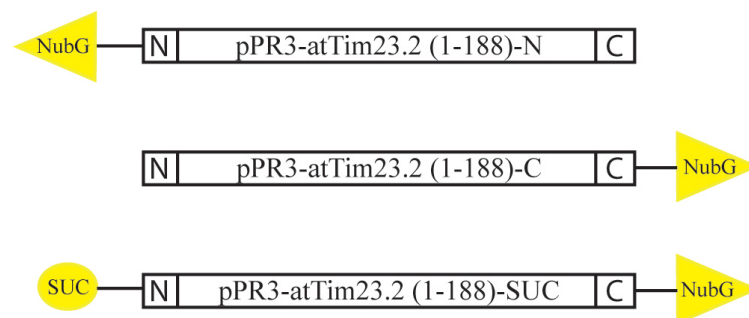


Abb. 3.18. Graphische Darstellung der pPR3-atTim23.2-N, pPR3-atTim23.2-C und pPR3-atTim23.2-SUC prey-Konstrukte.

Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektoren pPR3-N/C/SUC eingebracht und somit C-Terminal mit dem NubG-Fragment des Ubiquitins fusioniert. Zusätzlich wurde das Konstrukt pPR3-atTim23.2-Suc N-Terminal mit der SUC Signalsequenz fusioniert.

Anschließend erfolgte die Kotransformation des „bait“(pBT3-atTim23.2-SUC) Plasmids jeweils mit dem pPR3-atTim23.2-N, -C und -SUC prey-Konstrukt. Anschließend wurden die Hefezellen zur Analyse auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten aufgebracht (Abbildung 3.19). Alle drei Ansätze zeigen Wachstum auf den SD-Leu/Trp Platten (Abbildung 3.19, B, 1.Reihe). Dies zeigt, dass die Transformation von „bait“und „prey“erfolgreich war. Die Kotransformation von pBT3-atTim23.2-SUC mit pPR3-atTim23.2-N und pPR3-atTim23.2-SUC konnte zusätzlich ein Kolonienwachstum auf den SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten aufzeigen (Abbildung 3.19, B, 2.Reihe, Bild 2 und 3), während kein Wachstum mit dem pPR3-atTim23.2-C prey-Konstruktes detektiert werden konnte (Abbildung 3.19, B, 2.Reihe, Bild 1). Die Interaktion zwischen „bait“und „prey“führte hier also

zu einer Rekonstruktion des Ubiquitin und somit zur Herstellung von Histidin und Adenin, was das Wachstum auf den Interaktionsplatten ermöglichte. Demnach konnte eine Interaktion der porenbildenden Komponente atTim23.2 des TIM23-Komplexes der Mitochondrien mit sich selbst gezeigt werden. Die Ergebnisse sollten mit einem β -Galaktosidase Filter Lift Assay bestätigt werden. In Abbildung 3.19 C sind die Ergebnisse des Filter-Lift-Assay für den Versuch dargestellt. Eine deutliche Blaufärbung ist für die Zellen bei Kotransformation von pBT3-atTim23.2-SUC mit pPR3-atTim23.2-N und pPR3-atTim23.2-SUC ist zu erkennen (Abbildung 3.19, C). Eine Dimerisierung von atTim23.2 kann demnach belegt werden.

In den Versuchen konnte eine Interaktion von pBT3-atTim23.2-SUC sowohl mit pPR3-atTim23.2-N als auch pPR3-atTim23.2-SUC festgestellt werden. Um jedoch sicher zu gehen, dass es keine Interferenz zwischen zwei SUC-Signalen oder zwei ähnlich aufgebauten Proteine gibt, wurde für die weiteren Experimente der pPR3-N Vektor als prey-Vektor gewählt.

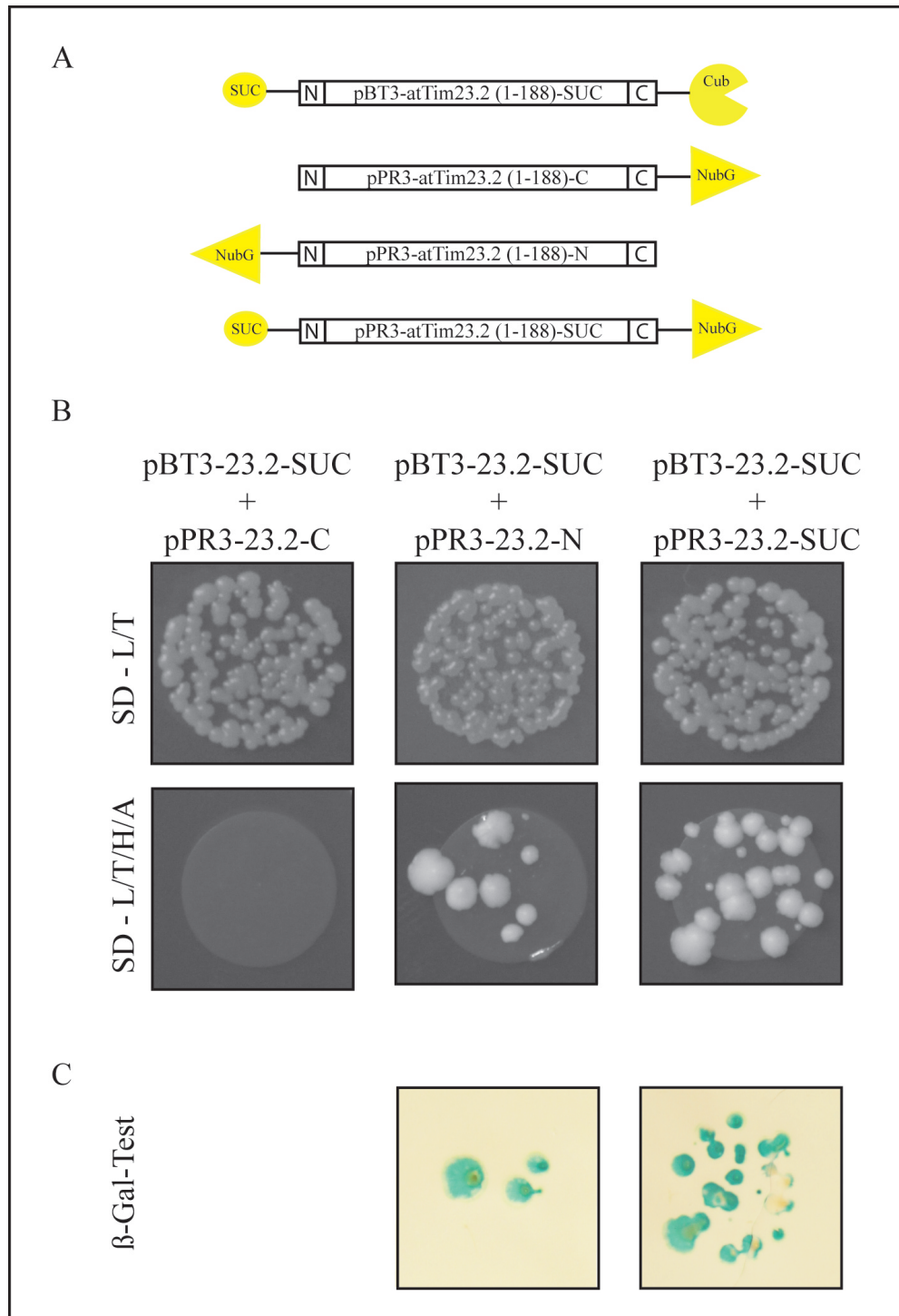


Abb. 3.19. Dimerisierung von atTim23.2

A: Graphische Darstellung des pBT3-atTim23.2-SUC bait-Konstruktes und den pPR3-atTim23.2-C, pPR3-atTim23.2-N und pPR3-atTim23.2-SUC als prey-Konstrukten. Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektor pBT3-SUC eingebracht und somit C-Terminal mit dem Cub-Fragment des Ubiquitins fusioniert und zusätzlich N-terminalen mit der SUC Signalsequenz. Die Gensequenz von atTim23.2 wurde außerdem in die Vektoren pPR3-N/C/SUC eingebracht und somit C-Terminal mit dem NubG-Fragment des Ubiquitins fusioniert. Zusätzlich wurde das Konstrukt pPR3-atTim23.2-Suc N-terminalen mit der SUC Signalsequenz fusioniert. **B:** Die Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit dem pBT3-atTim23.2-SUC Proteine als „bait“ jeweils mit pPR3-atTim23.2 -C/-N/-SUC als „prey“ ko-transformiert und zur Analyse auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten gespottet. **C:** Die Ergebnisse der Kotransformation von pBT3-atTim23.2-SUC mit pPR3-atTim23.2-N und -SUC wurden mit einem β -Galaktosidase Filter Lift Assay bestätigt (β -Gal-Test).

3.2.4. Identifizierung der Interaktionsdomäne von atTim23.2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass atTim23.2 mit sich selbst interagieren kann, sollte in einem nächsten Schritt die Stelle der Proteinsequenz identifiziert werden, welche für diese Interaktion verantwortlich ist. Hierfür wurden unterschiedliche Varianten des prey-Konstruktes hergestellt.

scTim23	MSWLF GDKTPTDDANA AVGGDTTKPKELSLKQSLGFEPNINNIISGP GGMHVDTARLHP
atTim23.2	M-----AANNRS DHGSDENTRL-----YNPYQN-----YEVPI NK SQY
scTim23	LAGDKGVEYLDL EEEQLSSLEGSQGLIPSRGWTDDL CYGTGAVYLLGLGI GGFSGMMOG
atTim23.2	LYKLPTSP EFLFT EE-----ALRQRRSWGENLT FYTGTAYL GGSVAGASVGVITG
scTim23	LQNI PPNSPGKLQLNTVLNHITKRGPFLGNNA GILALSYNIINSTIDALRGKHDTAGS IG
atTim23.2	VKSFE S GDTTKLK INRILNS S GQTGR TWGNRI GIIGLVYAGIESGIVAATDRDDWTSVV
scTim23	AGAL TGALFKSSKGLKPMGYSSAMVAAACAVWCSVK--KRLLEK
atTim23.2	AGLGTGAV CRAARGVRSAAVAGALGGLAAGAVVAGKQIVKRYVPI

Abb. 3.20. Sequenzalignment von atTim23.2 mit scTim23

Darstellung eines Sequenzvergleiches zwischen Tim23 aus *Saccharomyces cerevisiae* (scTim23) und Tim23.2 aus *Arabidopsis thaliana* (atTim23.2), welches mit dem Programm MAFFT nach Katoh erstellt wurde (Katoh et al. 2002; 2005). Das für die Dimerisierung von scTim23 charakteristische Hepta-Leucin-Zipper Motiv ist rot hinterlegt, das Cystein von atTim23.2 ist gelb gekennzeichnet. Schwarze Kästchen: identische Aminosäuren (AS); graue Kästchen: eine Konservierung durch chemisch ähnliche AS; Querstriche: Kennzeichnung von Positionen, an denen vom Programm für ein bestmögliches Alignment Leerstellen in die Sequenzen eingefügt wurden.

Die Dimerisierung von scTim23 erfolgt über ein hepta-Leucin-Zipper Motiv, welches in der zweiten Hälfte der hydrophilen N-terminalen Domäne lokalisiert ist (Bauer et al. 1996). Ein Abgleich der Aminosäuresequenzen von scTim23 und atTim23.2 zeigte bei atTim23.2, eine Struktur zwischen der Aminosäuren 34 und 54, welche dem Leucin-Zipper Motiv der Hefe ähnelt (Abbildung 3.20). Allerdings besitzt atTim23 im Vergleich zu scTim23 eine kurze Deletion die eins der drei Leucine des hepta-Leucin-Zipper Motives fehlen lässt. Um zu testen ob dieses Motiv trotzdem für die Interaktion von atTim23.2 verantwortlich ist, wurde das Konstrukt pPR3-atTim23.2(76-188)-N hergestellt, in welchem die ersten 75 Aminosäuren des Proteins und somit der N-terminale Bereich des Proteins entfernt wurden. Nachdem das Konstrukt auf seine Funktionalität getestet worden war, erfolgte die Kotransformation mit pBT3-atTim23.2-SUC. Zur Analyse wurden die Hefezellen wiederum auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten aufgebracht. Die erfolgreiche Transformation zeigt das Wachstum auf den SD-Leu/Trp Platten (Abbildung 3.21, B, 1.Spalte, oben). Kolonienwachstum auf den SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten konnte ebenfalls aufgezeigt werden (Abbildung 3.21, B, 1.Spalte, unten). Eine daraus zu schließende Interaktion des Volllangen atTim23.2 mit dem N-terminalen verkürzten Konstrukt legt nahe, dass sich die Interaktionsdomäne nicht am N-Terminus von atTim23.2 befindet. Eine Dimerisierung über ein Leucin-Zipper-Motiv wie bei der Hefe kann somit ausgeschlossen werden.

Die Aminosäuresequenz von atTim23.2 besitzt ein einziges Cystein an Position 152 (Abbildung 3.20, gelber Kasten). Im Gegensatz dazu besitzt scTim23 gar kein Cystein. Es ist bekannt, dass an

der Dimerisierung von Proteinen oftmals intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Cysteinen beteiligt sind. Daher wurde untersucht, ob dieses Cystein für die Dimerisierung von atTim23 verantwortlich ist. Dazu wurden die Konstrukte pPR3-atTim23.2(Δ Cys/Ala₁₅₂)-N, in welchem das Cystein an Position 152 in ein Alanin ausgetauscht ist, sowie pPR3-atTim23.2(1-151)-N, in dem der C-Terminus samt Cystein (AS 152 bis 188) fehlt, hergestellt. Diese Konstrukte wurde mit pBT3-atTim23.2-SUC als bait-Konstrukt in Hefezellen ko-transformiert und auf SD-Leu/Trp Platten sowie SD-Leu/Trp/His/Ala ausplattiert. Auf allen Platten konnte Wachstum der Hefe-Kolonien beobachtet werden (Abbildung 3.21, B, 2. und 3.Spalte). Dies deutet darauf hin, dass sowohl atTim23.2(1-151) als auch atTim23.2(Δ Cys/Ala₁₅₂) in der Lage sind mit atTim23.2 zu interagieren. Damit konnte eine Rolle des Cysteins als auch des gesamten C-Terminus von atTim23.2 für die Dimerisierung von atTim23.2 ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse wurden mit einem β -Galaktosidase Filter Lift Assay bestätigt (Abbildung 3.21, C).

Die Dimerisierung von Membranproteinen kann ebenfalls über die innerhalb der Membran liegenden Transmembrandomänen stattfinden. Demzufolge wurde im Weiteren innerhalb der LOOPS aber auch innerhalb der Sequenz nach einer möglichen Interaktionsdomäne gesucht. In dem Konstrukt pPR3-atTim23.2(Δ 62-110)-N wurden die erste Transmembrandomäne sowie die erste LOOP des Proteins entfernt. Des Weiteren wurde das Konstrukt pPR3-atTim23.2(Δ 110-152)-N erstellt. Hierbei wurden die zweite und dritte Transmembrandomäne sowie der zweite LOOP entfernt. Die Kotransformation der beiden Konstrukte mit dem „bait“-Vektor pBT3-atTim23.2-SUC und die Analyse auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Es konnte geringes bis fehlendes Wachstum auf den Interaktionsplatten für beide Konstrukte detektiert werden. Eine eindeutige Aussage über eine mögliche Interaktionsdomäne war hierdurch nicht möglich. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um die Domäne, welche für die Dimerisierung von atTim23.2 verantwortlich ist, zu identifizieren.

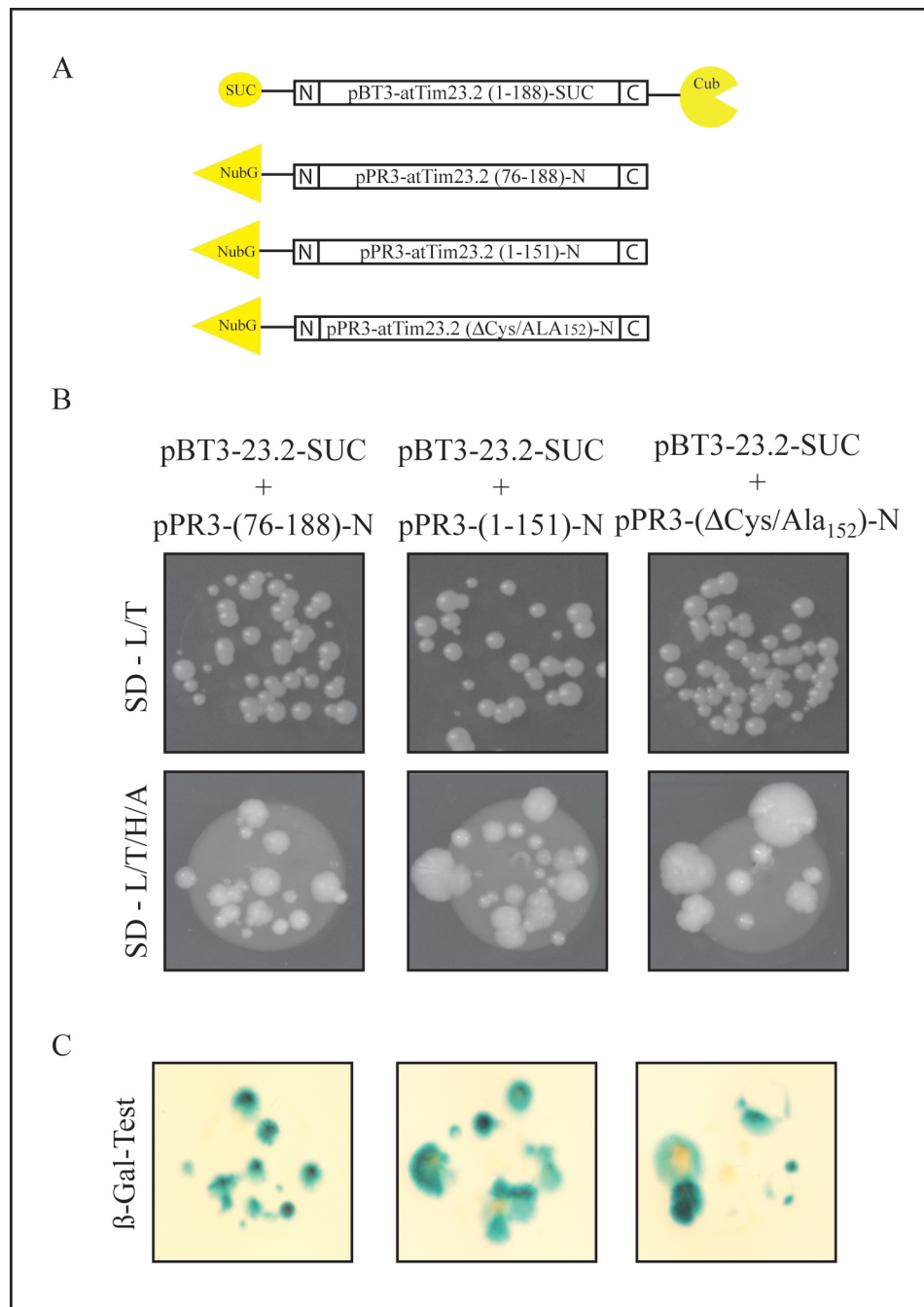


Abb. 3.21. Identifizierung der Interaktionsdomäne von atTim23.2 mittels verschiedener prey-Konstrukte

A: Graphische Darstellung des pBT3-atTim23.2-SUC „bait“-Konstruktes und der verkürzten atTim23.2-Konstrukte pPR3-atTim23.2(76-188)-N, pPR3-atTim23.2(1-151)-N und pPR3-atTim23.2(ΔCys/Ala₁₅₂)-N prey-Konstrukte. Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektor pBT3-SUC eingebracht und somit C-Terminal mit dem Cub-Fragment des Ubiquitins fusioniert und zusätzlich N-terminalen mit der SUC Signalsequenz. Die veränderte Gensequenz von atTim23.2 wurde außerdem in die Vektoren pPR3-N eingebracht und somit C-Terminal mit dem NubG-Fragment des Ubiquitins fusioniert. **B:** Die Hefezellen des Stammes NMY51 wurden mit dem pBT3-atTim23.2-SUC Proteine als „bait“ und mit pPR3-atTim23.2(76-188)-N, pPR3-atTim23.2(ΔCys/Ala₁₅₂)-N und pPR3-atTim23.2(1-151)-N als „prey“ ko-transformiert. Die Analyse erfolgte auf SD-Leu/Trp Transformationsplatten und auf SD-Leu/Trp/His/Ala Interaktionsplatten. **C:** Die Ergebnisse wurden mit einem β-Galaktosidase Filter Lift Assay bestätigt (β-Gal-Test).

3.3. Topologie von atTim23.2

AtTim23.2 gehört, sowie 17 weitere Proteine aus *A.thaliana*, zur Familie der Präproteine und Aminosäure Transporter (PRAT) Proteine (Rassow et al. 1999). Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist eine Struktur von vier Transmembrandomänen, welche durch drei kurze hydrophile LOOPS verbunden sind (Duncan et al. 2013). Im Folgenden sollte experimentell gezeigt werden, ob diese Eigenschaft auch auf das atTim23.2 Protein zutrifft.

3.3.1. Topologievorhersagen für atTim23.2

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Analyse der Topologie von atTim23.2 mittels der Datenbank ARAMEMNON durchgeführt. ARAMEMNON ist eine spezielle Datenbank zur Identifizierung aus *Arabidopsis* stammender Membranproteine (Schwacke et al. 2003). Zur Bestimmung der Topologie eines Proteins ermöglicht sie den direkten Vergleich von sieben unterschiedlichen Vorhersageprogrammen für Transmembrandomänen. Abbildung 3.22 (1) zeigt ein Modell von atTim23.2, welches aus den Ergebnissen der Datenbank erstellt wurde. Das Protein besitzt nach diesem Modell drei Transmembrandomänen (TMD). Die N-terminale Domäne (AS 1-62) ragt in den IMR, die C-terminale Domäne (AS 178-188) ist der Matrix zugewandt. Zwischen der ersten TMD (AS 63-82) und der zweiten TMD (AS 112-131) liegt der LOOP L1 (AS 83-111), welcher der Matrix zugewandt ist. Der LOOP L2 (AS 132-157) liegt zwischen der zweiten TMD (AS 112-131) und dritten TMD (AS 158-177). Dieser ragt in den IMR des Mitochondriums. Nach einem weiteren Modell besitzt atTim23.2 vier Transmembrandomänen (TMD), welche die innere Membran durchspannen (Murcha et al. 2003). Die N-terminale Domäne (AS 1-62) und C-terminale Domäne (AS 174-188) sind hier dem IMR zugewandt (Abbildung 3.22, Bild (2)). Zwischen der ersten TMD (AS 63-80) und der zweiten TMD (AS 111-122) liegt der LOOP L1, welcher der Matrix zugewandt ist. Der LOOP L2 ragt in den IMR und befindet sich zwischen der zweiten und dritten TMD. Zwischen der dritten TMD (AS 140-151) und vierten TMD (AS 162-174) liegt der LOOP L3. Dieser ragt wie der LOOP L1 in die Matrix des Mitochondriums. Beide Modelle (Abbildung 3.22, Bild (1) und (2)) sind in ihrem Aufbau sehr ähnlich, strukturell unterscheiden sie sich jedoch in der Anzahl der Transmembrandomänen. Im Folgenden sollte geklärt werden welches der beiden der tatsächlichen Topologie von atTim23.2 entspricht.

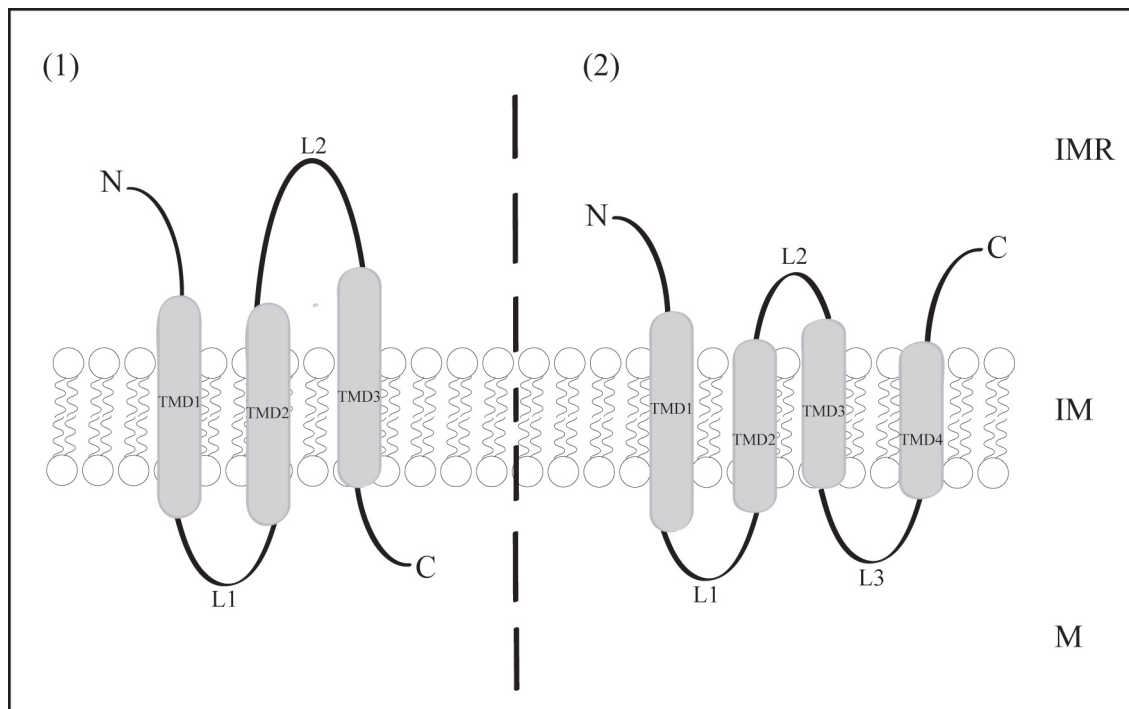


Abb. 3.22. Model der Topologie von atTim23.2 nach ARAMEMNON (1) und (Murcha et al. 2003) (2)

(1) Nach ARAMEMNON umfasst die Aminosäuresequenz von atTim23.2 188 Aminosäuren (AS) und besitzt drei TMD. Die N-terminale Domänen (AS 1-62) ragt in den IMR, die C-terminale Domäne (AS 178-188) ist der Matrix zugewandt. Zwischen den ersten TMD (AS 63-82) und zweiten TMD (AS 112-131) liegt der LOOP L1 (AS 83-111), welcher der Matrix zugewandt ist. Der LOOP L2 (AS 132-157), ragt in den IMR und befindet sich zwischen der zweiten und dritten TMD (AS 158-177). (2) Nach Murcha zeigt atTim23.2 eine Topologie von vier TMD. Die N-terminale Domänen (AS 1-62) und C-terminale Domäne (AS 174-188) sind beide dem IMR zugewandt. Zwischen den ersten TMD (AS 63-80) und zweiten TMD (AS 111-122) liegt der LOOP L1 (AS 80-110) und zwischen der dritten TMD (AS 140-151) und vierten TMD (AS 162-174) liegt der LOOP L3 (AS 151-161). Beide Loops sind der Matrix zugewandt. Der LOOP L2 (AS 122-140), ragt in den IMR und befindet sich zwischen der zweiten und dritten TMD. IMR: Intermembranraum; IM: Innere Membran; M: Matrix.

3.3.2. Untersuchungen der Topologie von atTim23.2 mit dem saGFP-System

Zur weiteren Analyse der Topologie von atTim23.2 wurde die Methode des „Self assembly-GFP“ Systems (saGFP) herangezogen. Das erst kürzlich entwickelte System ist eine Methode, um die Topologie von Membranproteinen *in vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen (Gross et al. 2011). Für dieses System wurde das GFP in zwei unterschiedlich große Teile gespalten: saGFP₁₋₁₀ besteht aus den β -Faltblättern eins bis zehn, während saGFP₁₁ aus dem β -Faltblatt elf gebildet wird. Keines der beiden Fragmente allein ist fähig zu fluoreszieren. Befinden sich beide Fragmente in demselben zellularen Kompartiment, sind sie in der Lage selbständig zu einem vollständigen Protein zu assemblieren und ein GFP-Signal kann detektiert werden. Im

Gegensatz zum split-GFP ist dafür keine direkte Interaktion der Fusionsproteine notwendig. Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen ist es möglich Markerproteine bekannter Lokalisierung einzusetzen. Diese können z.B. mit dem größeren Teil des GFP fusioniert werden, wobei das zu untersuchende Protein dann mit dem kleinen Teil des GFP fusioniert wird.

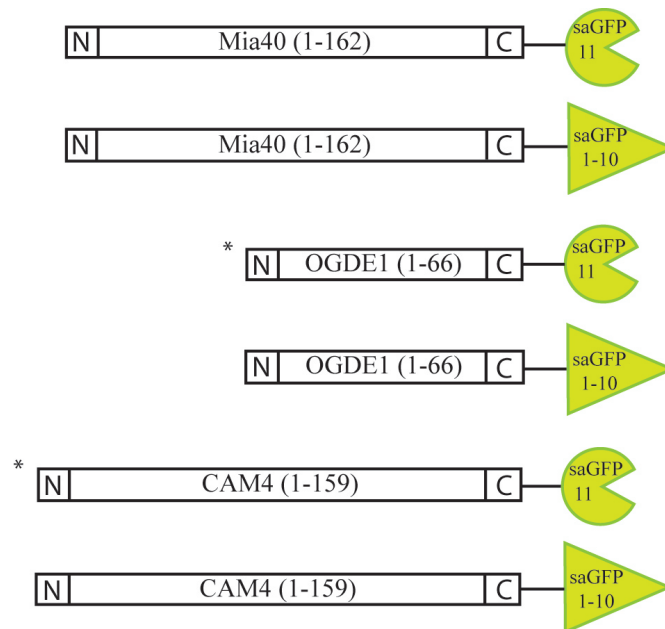


Abb. 3.23. Graphische Darstellung der Markerproteine Mia40, OGD E1 und CAM4 für das saGFP-System

Die Gensequenz von atMia40, welches im IMR der Mitochondrien lokalisiert ist, die Präsequenz von atOGD E1, ein Matrixprotein, und das cytosolische Protein atCAM4 wurden jeweils in den Vektor pBIN19saGFP₁₁C und pBIN19saGFP₁₋₁₀C eingebracht. Dabei wurden sie C-Terminal mit dem saGFP₁₋₁₀ und dem saGFP₁₁ fusioniert. Mit * gekennzeichnete saGFP₁₋₁₀ und dem saGFP₁₁ Konstrukte wurden von der AG Votknecht bereitgestellt.

Zur Untersuchung der Topologie von atTim23.2 wurden saGFP Fusionen mit CAM4, Mia40 und der Präsequenz von OGDE1 (2-Oxo-glutarat-hydrogenase E1) verwendet. CAM4 ist ein cytosolisches Protein, Mia40 ist im IMR der Mitochondrien lokalisiert. OGDE1 ist in der Matrix von Mitochondrien zu finden. Die jeweiligen Sequenzen wurden in binäre Vektoren kloniert, welche sie C-Terminal mit saGFP₁₋₁₀ bzw. saGFP₁₁ fusionierten (Abbildung 3.23).

Zunächst wurde die Lokalisierung und Funktionalität der Markerproteine getestet. Die Plasmide der verschiedenen saGFP₁₋₁₀ und saGFP₁₁ Konstrukte wurden dafür in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und in einem 1:1 Gemisch in Blattmesophyllzellen von *Nicotiana benthamiana* infiltriert und für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Blattabschnitte auf GFP Fluoreszenzsignale untersucht. Zur genaueren Analyse wurden aus den transformierten Blättern Protoplasten isoliert und die in den Protoplasten beobachteten Fluoreszenzsignale anschließend mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die Kotransformation mit Mia40-

saGFP₁₋₁₀ und Mia40 saGFP₁₁, sowie OGDE1-saGFP₁₋₁₀ und OGDE1-saGFP₁₁, führte jeweils zu einer Assemblierung des GFP, was durch das Auftreten eines GFP-Signales deutlich wird (Abbildung 3.24, A und B, Bild 1). Das Signal trat jeweils in punktuellen Strukturen auf und überlappte mit dem Signal, welches nach Behandlung mit Mitotracker[®] CMS Ros sichtbar wurde (Abbildung 3.24, A und B, Bild 2). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Markerproteine korrekt in den Mitochondrien lokalisiert sind. Die Kotransformation mit CAM4-saGFP₁₋₁₀ und CAM4-saGFP₁₁ führte ebenfalls zum Auftreten eines GFP-Signales (Abbildung 3.24, C, Bild 1). Das Signal ist überall im Zytosol verteilt. Die Fluoreszenz überlagerte sich nicht mit der Autofluoreszenz des Chlorophylls oder der Fluoreszenz des Mitotrackers[®]. Damit kann eine cytosolische Lokalisierung bestätigt werden. Zur Kontrolle wurden OGDE1-saGFP₁₋₁₀ und Mia40-saGFP₁₁ ko-transformiert. Damit sollte gezeigt werden, dass das System nur funktioniert wenn beide Proteine im gleichen Kompartiment vorliegen. Wie erwartet, konnte ein GFP-Signal nicht detektiert werden (Abbildung 3.24, D, Bild 1). Dieses Ergebnis bestätigte zudem, dass beide Fusionsproteine tatsächlich in unterschiedlichen Subkompartimenten der Mitochondrien lokalisiert sind. Auf diese Weise konnte die Funktionalität des Systems für die vorgesehenen Untersuchungen gezeigt werden.

Nachdem die Lokalisierung und die Funktionalität der Markerproteine bestätigt werden konnte, wurde die Lokalisierung des N-terminalen und des C-terminalen Bereiches von atTim23.2 analysiert. Dazu wurde die atTim23.2 Gensequenz C-Terminal mit saGFP₁₋₁₀ und saGFP₁₁ sowie N-Terminal mit saGFP₁₁ fusioniert (Abbildung 3.25, A). Wurden die C-terminalen Fusionskonstrukte atTim23.2-saGFP₁₋₁₀ und atTim23.2 saGFP₁₁ miteinander ko-transformiert, konnte ein GFP-Signal detektiert werden (Abbildung 3.25, B, Bild 1). Das Signal zeigt punktuelle Strukturen und überlagerte sich mit der Mitotracker[®]-Färbung. Da beide markierten C-terminale Bereiche auf derselben Seite der inneren Membrane der Mitochondrien lokalisiert sein sollten, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Allerdings zeigt dieses Ergebnis nicht, auf welcher Seite der Membran der C-Terminus lokalisiert ist. Eine Kotransformation des C-Terminal markierten atTim23.2-saGFP₁₋₁₀ mit dem N-Terminal markierten atTim23.2-saGFP₁₁ sollte Aufschluss über die relative Lage der beiden Termini zur Membran geben. Ein GFP-Signal zwischen den beiden Konstrukten würde darauf hindeuten, dass beide Termini auf derselben Seite der Membrane lokalisiert sind und somit eine Topologie von vier Transmembrandomänen nahelegen. Im Gegensatz dazu, würde ein fehlendes GFP-Signal zwischen den beiden Konstrukten auf eine Topologie von drei Transmembrandomänen hindeuten. In Abbildung 3.25B ist sowohl ein GFP-Signal als auch das Signal des Mitotrackers[®] zu erkennen. Diese ergeben ein gleiches Muster und zeigen dabei deutliche Überlagerung (Abbildung 3.25, B, 1. und 2.Reihe, Bild 1 und 2). Demnach müssen der N-Terminus und der C-Terminus auf der gleichen Membranseite und zwar im IMR der Mitochondrien lokalisiert sein, da für den N-Terminus bereits eine Lokalisierung im IMR nachgewiesen wurde (Murcha et al. 2003). Diese Ergebnisse bestärken das Topologie-Model für atTim23.2 mit vier Transmembrandomänen (siehe Abbildung 3.22).

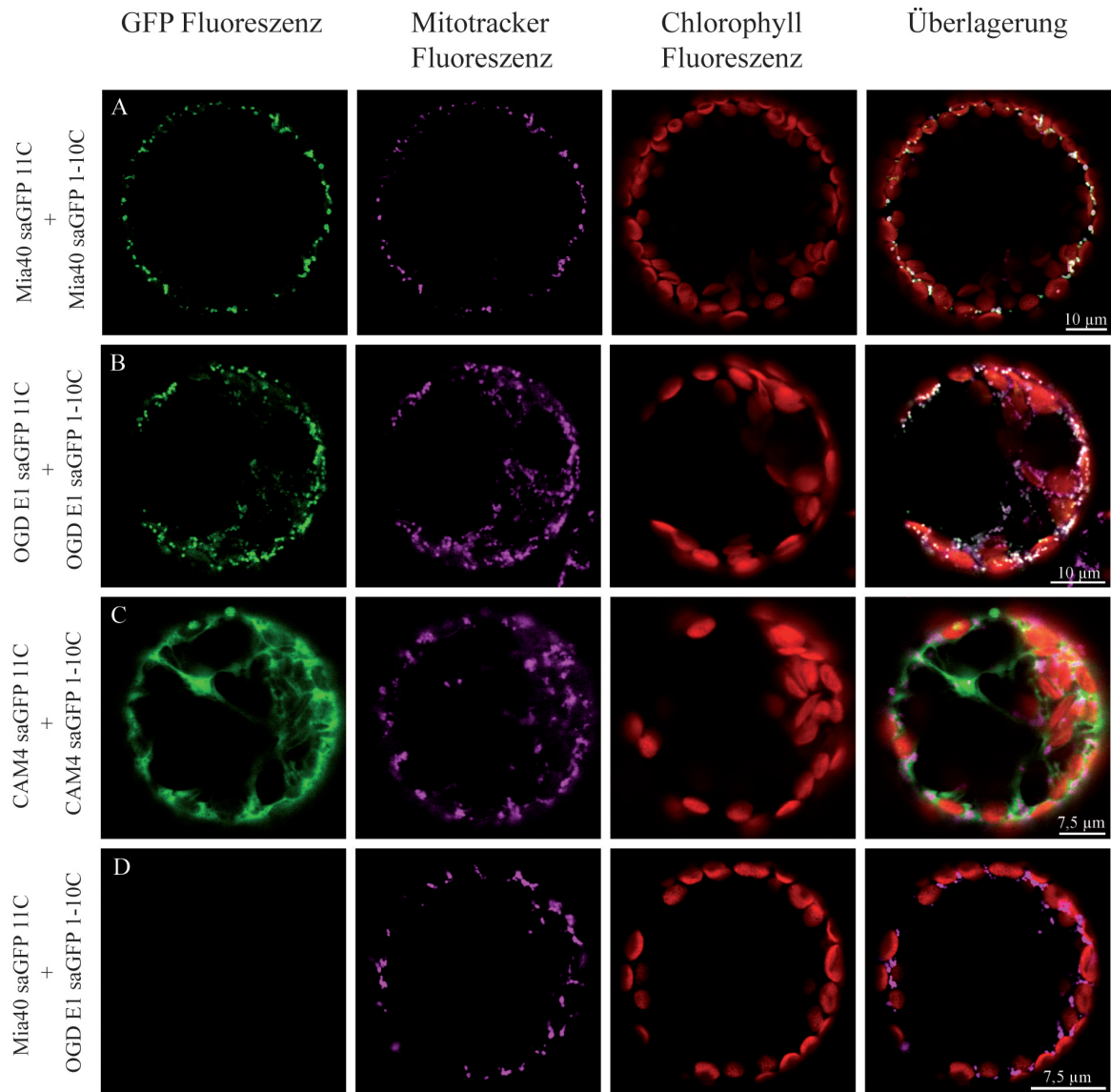


Abb. 3.24. Fluoreszenzanalyse von *N.benthamiana* Protoplasten die Fusionsproteine von saGFP 1-10C und 11C von Mia40, OGD E1 und CAM4 ko-exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker® gefärbt wurden.

Blätter von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden mit unterschiedlichen pBIN19saGFP_{1-10C} und pBIN19saGFP_{11C} Konstrukten ko-transformiert. Nach erfolgreicher Expression wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und die Mitochondrien mit Mitotracker® CMX Ros angefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzmikroskopie. Erste Spalte: GFP Fluoreszenz der saGFP_{1-10C} und saGFP_{11C} Fusionsproteine. Zweite Spalte: Fluoreszenz des Mitotracker®. Dritte Spalte: Autofluoreszenz des Chlorophylls. Vierte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

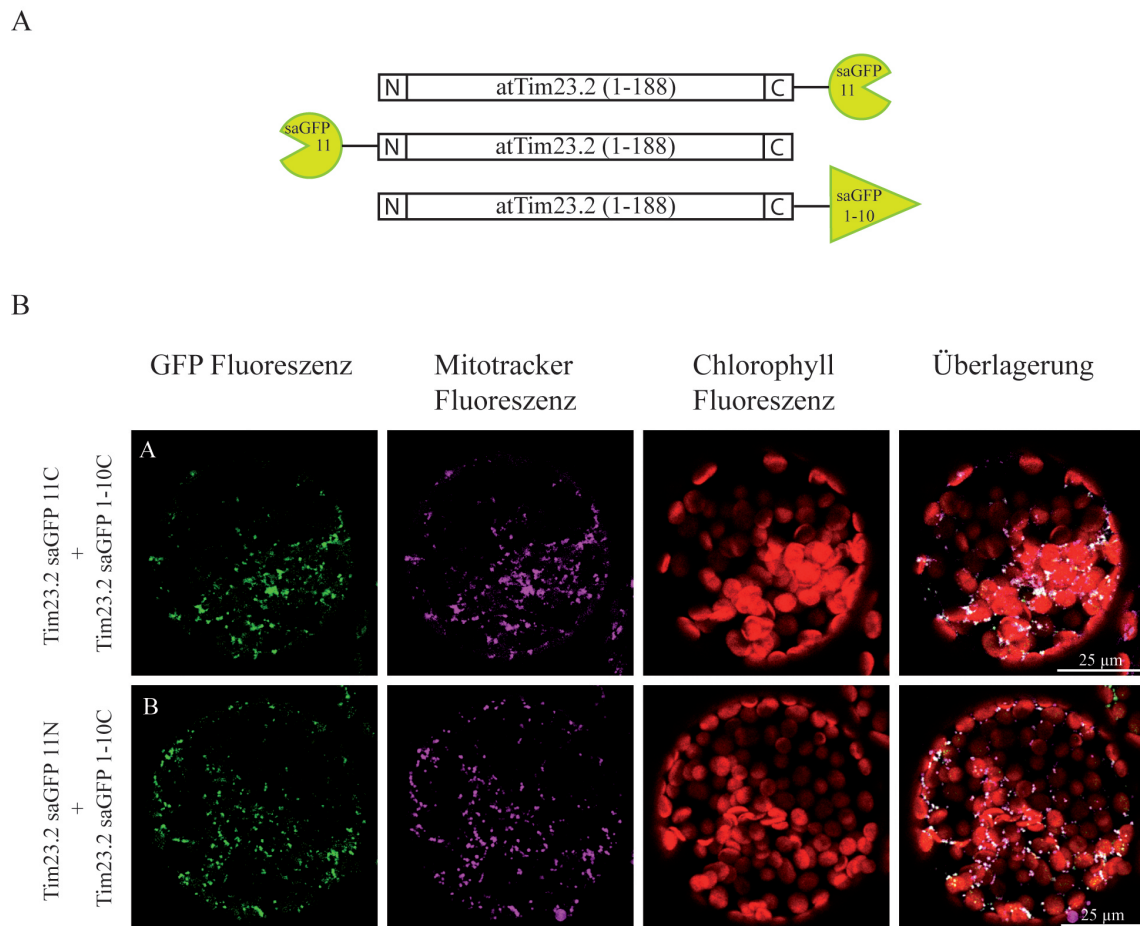


Abb. 3.25. Fluoreszenzanalyse von *N.benthamiana* Protoplasten die Fusionsproteine von saGFP 1-10C und 11C sowie saGFP 11N von atTim23.2 ko-exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker® gefärbt wurden.

A: Graphische Darstellung von atTim23.2 für das saGFP-System. Die Gensequenz von atTim23.2 wurde in die Vektoren pBIN19saGFP_{11N}, pBIN19saGFP_{11C} und pBIN19saGFP_{1-10C} eingebracht. Dabei wurde die C-Terminal mit dem saGFP₁₋₁₀ und dem saGFP₁₁ oder N-Terminal mit dem saGFP₁₁ fusioniert. **B:** Blätter von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden mit unterschiedlichen pBIN19saGFP_{1-10C} und pBIN19saGFP_{11C}, sowie saGFP_{11N} Konstrukten ko-transformiert. Nach erfolgreicher Expression wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und die Mitochondrien mit Mitotracker®CMX Ros angefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzmikroskopie. Erste Spalte: GFP Fluoreszenz der saGFP_{1-10C} und saGFP_{11C}, sowie der saGFP_{11N} Fusionsproteine. Zweite Spalte: Fluoreszenz des Mitotrackers®. Dritte Spalte: Autofluoreszenz des Chlorophylls. Vierte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

Es wurden danach weitere Kotransformationen durchgeführt, um die bisher erhaltene Ergebnisse zu untermauern. Dazu wurden die mit saGFP₁₁ fusionierten atTim23.2 Konstrukte mit Mia40-saGFP₁₋₁₀ und mit OGDE1-saGFP₁₋₁₀ ko-transformiert (Abbildung 3.26). Wie erwartet, konnte ein GFP-Signal detektiert werden, wenn das N-Terminal oder C-Terminal markierte atTim23.2-saGFP₁₁ mit Mia40-saGFP₁₋₁₀ ko-transformiert wurden (Abbildung 3.26, A und B, Bild 1). Wurden diese Konstrukte jedoch mit OGDE1-saGFP₁₋₁₀ ko-transformiert, konnte kein GFP-Signal detektiert werden. Diese Ergebnisse untermauern die exklusive Lokalisierung des N-

als auch des C-Terminus von atTim23.2 im Intermembran (Abbildung 3.26, C und D, Bild 1). Es ist bekannt, dass die Fusion mit einem GFP-tag zu Fehllokalisationen oder falsch gefalteten Proteinen führen kann (Waldo et al. 1999). Als weitere Kontrolle wurde daher eine Kotransformation des C-Terminal markierten atTim23.2-saGFP₁₁ mit CAM4-saGFP₁₋₁₀ durchgeführt. Dabei zeigte sich kein GFP-Signal (Abbildung 3.26, E, Bild 1), was bedeutet, dass weder atTim23.2-saGFP₁₁ im Zytosol verbleibt noch CAM4-saGFP₁₋₁₀ unspezifisch in die Mitochondrien gelangt. Eine Fehllokalisierung oder Fehltransport der saGFP-Konstrukte in den Organellen kann demnach weitestgehend ausgeschlossen werden.

Somit konnte ein weiterer Beleg dafür erbracht werden, dass beide Termini von atTim23.2 im IMR der Mitochondrien lokalisiert sind, und dass atTim23.2, wie für andere Proteine der PRAT Familie beschrieben, vier Transmembrandomänen besitzt, welche durch drei kurze hydrophile LOOPS verbunden sind (Abbildung 3.22, Bild (2)).

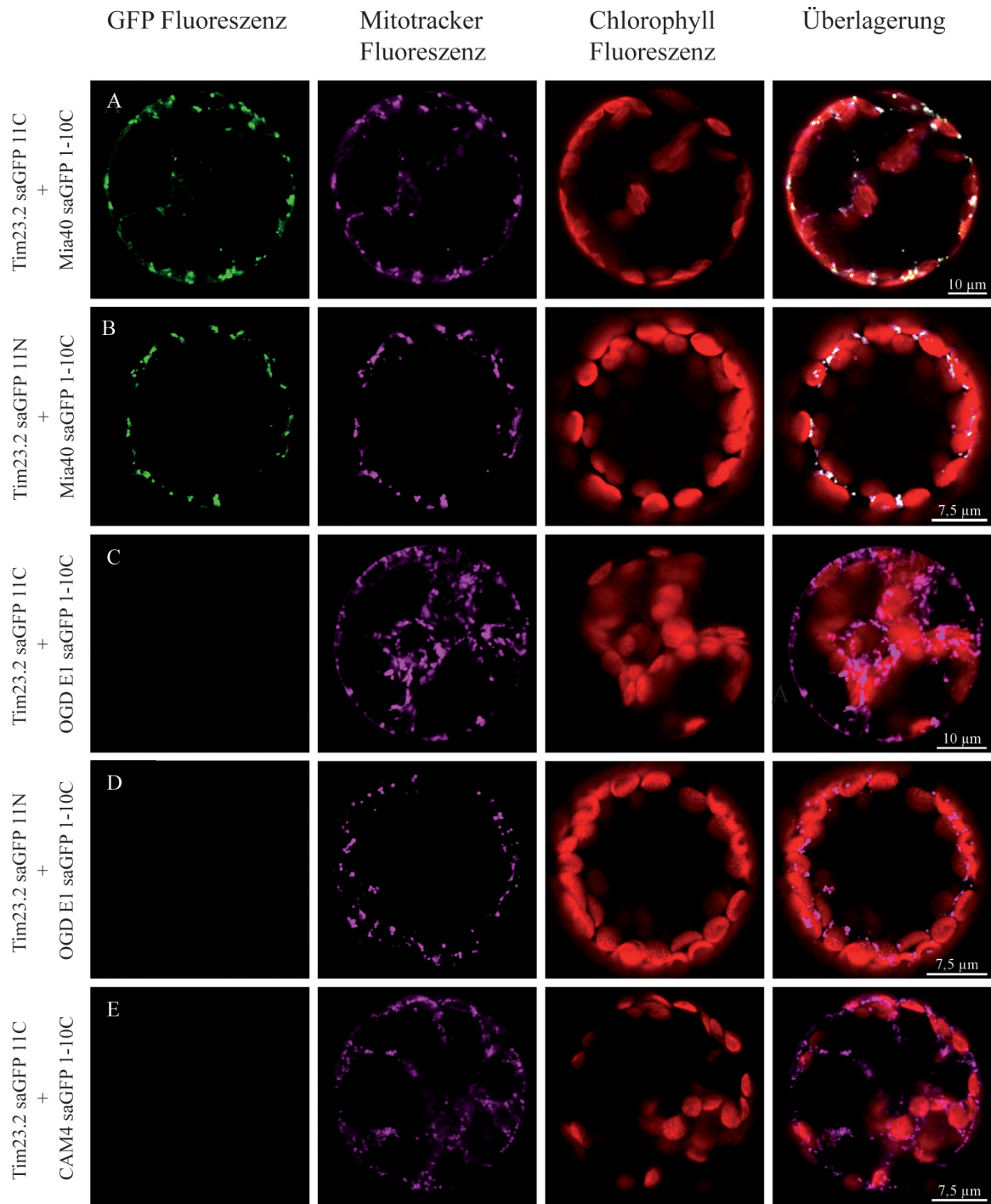


Abb. 3.26. Fluoreszenzanalyse von *N.benthamiana* Protoplasten die Fusionsproteine von saGFP₁₋₁₀ und saGFP₁₁ von Mia40, OGD E1 und CAM4 und von atTim23.2 ko-exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker® gefärbt wurden.

Blätter von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden mit unterschiedlichen pBIN19saGFP_{1-10C} und pBIN19saGFP_{11C}, sowie saGFP_{11N} Konstrukten ko-transformiert, exprimiert und aus den Blättern Protoplasten isoliert. Anschließend erfolgte zur Analyse der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Mitochondrien wurden mit Mitotracker® CMX Ros angefärbt. Erste Spalte: GFP Fluoreszenz der saGFP_{1-10C} und saGFP_{11C}, sowie der saGFP_{11N} Fusionsproteine. Zweite Spalte: Fluoreszenz des Mitotracker®. Dritte Spalte: Autofluoreszenz des Chlorophylls. Vierte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

4. Diskussion

Kalzium ist ein universeller sekundärer Botenstoff, welcher durch Einstromen aus dem Apoplasten oder internen Speichern in das Zytosol externe Signale intrazellulär weiterleitet. Durch den Einstrom von Kalzium entsteht eine Änderung der Kalzium-Ionen-Konzentration, die in Pflanzen durch spezifische Sensoren wie Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs), Calmoduline oder Calcineurin B-ähnliche Proteinen (CBLs) wahrgenommen und in eine zelluläre Antwort umgewandelt wird. Diese Regulation ist ein eukaryotisches Merkmal; neueste Studien konnten jedoch zeigen, dass auch die Organellen prokaryotischen Ursprungs, wie Chloroplasten und Mitochondrien in das Kalzium-Signalnetzwerk eingebunden sind (DeFalco et al. 2010). In Mitochondrien wurde gezeigt, dass der Import von Kern-codierten Proteinen durch Kalzium und Calmodulin reguliert ist (Kuhn et al. 2009). So erbrachten Importexperimente mit Calmodulin-Inhibitoren und Kalzium-Ionophoren den Nachweis, dass diese Regulation an der inneren Membran am TIM22- und TIM23-Komplex stattfindet. Die Vermittler dieses Prozesses blieben bis dato jedoch unbekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Komponenten der TIM22- und TIM23-Komplexe identifiziert werden, welche an dieser Kalzium/Calmodulin-Regulation der Mitochondrien beteiligt sind. *In silico* Untersuchungen führten zur Identifizierung von Tim23 aus *Arabidopsis thaliana* (atTim23) als potentes Calmodulin-bindendes Protein. atTim23 ist eine Komponente des inneren Membrankanals TIM23 und verantwortlich für den Import von Matrixproteinen mit N-terminalen Signalsequenz (Murcha et al. 2012). Die Analyse des Genoms von *A.thaliana* zeigt drei Isoformen von Tim23, atTim23.1, atTim23.2 und atTim23.3, die sich in ihrer Struktur sehr ähnlich sind (Murcha et al. 2003). Die folgenden Untersuchungen wurden mit dem atTim23.2 Protein durchgeführt, da dieses Protein Transkriptionsanalysen nach am höchsten exprimiert wird (Murcha et al. 2003). Es konnte außerdem in früheren Experimenten gezeigt werden, dass atTim23.2 einen Teil des TIM23-Komplexes der inneren Membran der Mitochondrien darstellt (Wang et al. 2012). Untersuchungen mit rekombinantem atTim23.2 konnten eine Kalzium-abhängige Interaktion mit Calmodulin bestätigen (Abbildung 3.4, B (1)). Dieses Ergebnis zeigen, dass atTim23.2 eine mögliche Komponente für eine Regulation des Proteinimportes durch das Kalzium-Signalnetzwerk innerhalb der inneren Mitochondrienmembran darstellt. Eine Calmodulin-Bindung von atTim17.2, einer weiteren Komponente des TIM23-Komplexes, konnte gleichzeitig ausgeschlossen werden (Abbildung 3.4, B (2)). atTim23.2 gehört wie atTim17.2 zur Familie der Präprotein und Aminosäure Transporter (PRAT) Proteine (Rassow et al. 1999). PRAT-Proteine sind durch eine Struktur von vier Transmembrandomänen, die durch drei hydrophile LOOPS verbunden sind, charakterisiert und tragen ein konserviertes Motiv

(G/AX₂F/YX₁₀RX₃DX₆(G/A/S)GX₃G), welches als PRAT-Domäne bezeichnet wird. atTim23.2 und atTim17.2 besitzen beide eine interne Signalsequenz und zeigen keine Introns in ihrer Nukleinsäuresequenz auf. Dass atTim23.2 im Gegensatz zu atTim17.2 an Calmodulin binden kann deutet darauf hin, dass es sich hierbei um eine spezifische Eigenschaft von Tim23.2 handelt. Eine unspezifische Interaktion basierend auf der generellen Struktur der PRAT-Proteine kann somit ausgeschlossen werden. atTim23.2 scheint demnach das Calmodulin-bindende Protein innerhalb des TIM23-Komplexes zu sein. Anschließend stellte sich die Frage, wo die Calmodulin-Bindedomäne (CaMBD) in der Sequenz von atTim23.2 zu finden ist. Interessanterweise konnten durch *in silico* Untersuchungen zwei potentielle CaMBDs identifiziert werden; eine im N-terminalen Bereich (AS 49-69) und die zweite in der ersten LOOP (AS 80-97) des Proteins (Abbildung 3.1). Beide Bereiche erfüllen die charakteristischen Merkmale bereits identifizierter CaMBDs; eine Länge von ca. 20 Aminosäuren, Verteilung hydrophober AAs nach bekannten Motiven, eine positive Nettoladung und die Ausbildung einer amphiphilen α -Helix (Abbildung 3.2). Untersuchungen mit rekombinanten atTim23.2 Konstrukten, die nur den N-Terminus (AS 1-70) oder Loop1 (AS 80-110) umfassten, bestätigten die Kalzium-abhängige Interaktion mit Calmodulin für beide Domänen (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7), die genaue Position der Bindestelle konnte jedoch nicht identifiziert werden. Hierfür sind weitere Experimente mit Proteinvarianten notwendig, in welchen spezifisch die potentiellen Bindedomänen fehlen bzw. für die Bindung wichtige Aminosäuren mutiert sind.

Um zu verstehen, welche Rolle die Interaktion mit Calmodulin für Tim23.2 spielt, ist es wichtig, die genaue Topologie des Proteins und damit auch die Lage der CaMBDs zu kennen. Hierfür wurden Analysen zur Topologie des atTim23.2 Proteins durchgeführt, da die Struktur des Proteins zwar vorhergesagt, jedoch experimentell nicht vollständig geklärt war. Der N-terminale Bereich von atTim23.2 konnte bereits in früheren Untersuchungen als dem Intermembranraum (IMR) der Mitochondrien zugewandt lokalisiert werden (Murcha et al. 2003). Für fünf der 17 in *A.thaliana* identifizierten PRAT-Proteine, inklusive atTim23.2 wurde zudem eine Topologie von vier Transmembrandomänen (TMD) vorhergesagt (Murcha et al. 2007). Eigens durchgeführte *in silico* Untersuchungen konnten diese Annahme zunächst nicht bestätigen und sagten eine Topologie mit nur 3 TMD vorher (Abbildung 3.22, (1)). Mit Hilfe von „self assembling GFP“ (saGFP) konnte allerdings gezeigt werden, dass es sich bei atTim23.2 tatsächlich um ein Protein mit vier TMD handelt (Abbildung 3.25). Die damit einhergehende, exklusive Lokalisierung des N- als auch des C-Terminus von atTim23.2 im IMR von Mitochondrien konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 3.26). Die im N-terminalen Bereich identifizierte CaMBD ist somit im IMR und die innerhalb der ersten LOOP identifizierte CaMBD in der Matrix lokalisiert. Die Regulation durch Calmodulin von atTim23.2 könnte somit innerhalb zwei unterschiedlicher Reaktionsräume, dem IMR und der Matrix, der Mitochondrien stattfinden. Der TIM23-Komplex existiert in zwei dynamischen Formen: „TIM23-SORT“ und „TIM23-MOTOR“ (Lister et al. 2005, Murcha et al. 2014a). Während TIM23-SORT die Insertion von Proteinen in die innere Membran

vermittelt, sorgt der MOTOR für den Transport der Proteine über die innere Membran in die Matrix. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die im IMR identifizierte CaMBD von atTim23.2 den „TIM23-SORT“ und die in der Matrix identifizierte CaMBD den „TIM23-MOTOR“ regulieren könnte. Eine Funktion der potentiellen CaMBD in der Rekrutierung und in dem Transport von Vorstufenproteinen könnte demnach gegeben sein, muss jedoch in weiteren Versuchen experimentell bestätigt werden.

Zur Identifizierung möglichen Regulatoren von atTim23.2 wurde nach Calmodulinen und Calmodulin-ähnlichen Proteinen (CMLs) gesucht, welche eine mitochondriale Lokalisierung aufweisen. Das erst kürzlich in den Mitochondrien detektierte atCML30 schien hierfür ein viel versprechender Kandidat zu sein (Chigri et al. 2012). Da die CaMBD von atTim23.2 im IMR sowie in der Matrix identifiziert wurden, sollte mit Hilfe des „self assembling GFP“ (saGFP) die genaue Position von atCML30 im Mitochondrium analysiert werden. Durch die Koloalisation mit Mia40 konnte eine Lokalisation des Proteins im mitochondrialen IMR belegt werden (Abbildung 3.10). Damit wäre atCML30 ein möglicher Interaktionspartner für die im N-terminus befindliche CaMBD, da beide im IMR lokalisiert sind. Allerdings konnte *in vitro* mittels Quervernetzungsexperimente keine Bindung zwischen atCML30 und atTim23.2 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Da Probleme mit Aggregation bzw. Faltung vom Vollängen Tim23.2 nicht ausgeschlossen werden kann, könnte die CaMBD unter diesen Bedingungen für eine Interaktion nicht zugänglich gewesen sein. Eine Quervernetzungsanalyse zwischen dem rekombinanten löslichen N-terminalen Bereich von atTim23.2 und atCML30 könnte demnach eine erfolgversprechende Möglichkeit sein, um eine solche Interaktion zu belegen. Zusätzlich wurde atCML30 in einem Split-Ubiquitin-Assay als „bait“-Konstrukt und atTim23.2 als „prey“-Konstrukt getestet, um eine mögliche Interaktion *in vivo* aufzuzeigen. Das System war zuvor erfolgreich zur Analyse der Topologie und Dimerisierung von atTim23.2 verwendet worden (siehe unten). Leider zeigte atCML30 eine Autoaktivierung (Daten nicht gezeigt). Generell ist das Split-Ubiquitin-System für lösliche Proteine nicht geeignet, denn sind diese mit dem Reporter gekoppelt, kommt es vor, dass sie selbständig in den Kern wandern können.

Tim23 wird in der Literatur als porenbildende Komponente des TIM23-Komplexes bezeichnet (Murcha et al. 2014b). Bis dato gibt es jedoch keine eindeutigen Erklärungen, wie genau diese Pore reguliert wird. Eine Dimerisierung des Proteins könnte möglicherweise dafür verantwortlich sein. Im Falle von scTim23 aus der Hefe konnte ein solcher Mechanismus, vermittelt über ein im N-terminalen Bereich lokalisiertes Leucin-Zipper-Motiv, gezeigt werden (Bauer et al. 1996). Gleichzeitig stellt der N-Terminus des Proteins eine Verbindung zur äußeren Membran her und interagiert mit Präsequenzen von Vorstufenproteinen für den Import in die Matrix. Mit der Hilfe der C-terminalen Domäne ist das Protein fähig, einen Kation-selektiven Kanal, aktiviert über das Membranpotential, zu bilden (Truscott et al. 2001). Es wurde postuliert, dass eine Dimerisierung von scTim23 zum Schließen der Importpore führt. Die Bindung einer Präsequenz

an den N-terminalen Bereich des Proteins würde zur Destabilisierung des Dimers und somit zum Öffnen der Pore führen. Untersuchungen mittels Größenausschluss-chromatographie konnten außerdem zeigen, dass der N-terminale Bereich von Tim23 aus *H.sapiens* ebenfalls als Dimer vorliegt (Zhang et al. 2012). Tatsächlich konnte die Dimerisierung von atTim23.2 mittels Split-Ubiquitin Systems nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten eine Interaktion von atTim23.2 mit sich selbst (Abbildung 3.19), was eine Dimerisierung von atTim23.2 *in vivo* wahrscheinlich erscheinen lässt. Die Suche nach der Domäne, welche für die Dimerisierung verantwortlich ist, blieb jedoch erfolglos. Sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich außerhalb der ersten und letzten TMD sind aufgrund der Ergebnisse der Split-Ubiquitin Analyse nicht an der Dimerisierung beteiligt (Abbildung 3.21). Dies bedeutet, dass das am N-Terminus befindliche Hepta-Leucin-Zipper-ähnliche Motiv sowie die erste CaMBD nicht für die Dimerisierung verantwortlich sind (Abbildung 3.21, B, erste Spalte). Die Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke durch ein am C-Terminus befindliches Cystein kann ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 3.21, B, Spalte 2 und 3). Die Dimerisierung von Membranproteinen wird allerdings häufig innerhalb der Membran durch die TMD selbst vermittelt. Für die weiteren Untersuchungen wurden aus diesem Grund Konstrukte erstellt, in denen die TMD1 sowie die erste LOOP bzw. die TMD2 und TMD3, sowie der zweite LOOP des Proteins entfernt wurden. Die Kotransformation dieser Konstrukte als Prey, im Split-Ubiquitin-System, mit dem volllangen atTim23.2 als Bait führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Vermutung liegt nahe, dass die Konstrukte durch das Fehlen der TMD nicht korrekt gefaltet bzw. in die Membran eingebaut werden können. Demzufolge kann ausbleibendes Wachstum auf den Interaktionsplatten bedeuten, dass i) die Bindestelle nicht vorhanden ist oder ii) durch die falsche Insertion kein aktives Ubiquitin gebildet werden kann. Innerhalb des ersten LOOPS befindet sich allerdings auch die zweite CaMBD. Das Fehlen dieser Domäne könnte also dazu führen, dass eine Interaktion von atTim23.2 mit sich selbst nicht mehr möglich ist. Dies könnte ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Dimerisierung und der Kalzium/Calmodulin-Regulation von atTim23.2 sein. Dafür würde in dem System allerdings ein Calmodulin als Interaktionspartner benötigt werden. Dieses Calmodulin könnte von der Hefe selber stammen, da das Vorhandensein von Calmodulin im Zytosol von *S.cerevisiae* lange bekannt ist (Davis et al. 1986). Allerdings sind weitere Versuche nötig, um die Domäne, die für die Dimerisierung von atTim23.2 verantwortlich ist, eindeutig zu detektieren.

Eine Interaktion von α -helicalen Strukturen der TMD könnte beispielsweise auch über van-der-Waals Kräfte (MacKenzie et al. 1997) sowie GxxxG und GxxxG- ähnliche Motive (Senes et al. 2004) stattfinden. Die Analyse der Aminosäuresequenz von atTim23.2 zeigt, dass alle vier TMD solche Motive beinhalten (Abbildung 4.1).

Importkanals benötigt wird, um eine Verbindung mit dem TOM-Komplex herzustellen. Tim17.2 scheint hier mit seiner C-terminalen Domäne die Funktion der N-terminalen Verlängerung von scTim23 zu übernehmen. Damit ist das Protein fähig, eine Verbindung zwischen innerer und äußerer Membran herzustellen und dabei gleichzeitig mit Vorstufenproteinen zu interagieren (Murcha et al. 2005). Eine Interaktion zwischen Tim23.2 und Tim17.2 scheint demnach essentiell zu sein, um sicherzustellen, dass Vorstufenproteine nach dem Eintritt in den IMR zur Importpore gelangen können. Inwieweit die Importpore des TIM23-Komplexes durch eine Dimerisierung von atTim23.2 gebildet wird, muss weiterhin untersucht werden. Es wird jedoch deutlich, dass eine enge Verbindung oder Wechselwirkung mit atTim17.2 notwendig ist. Darüber hinaus wird vermutet, dass der Mechanismus zur Bildung der Importpore in *A.thaliana* ein pflanzenspezifisches Charakteristikum darstellt, da sich dieser von dem in der Hefe und Säugern unterscheidet. Die Calmodulin-bindung an Tim23.2 könnte ein Bestandteil eines solchen Mechanismus sein.

Mitochondrien sind an einer Vielzahl von Stressreaktionen und –anpassungen in der Pflanze beteiligt (Van Aken et al. 2009). Dabei gibt es diverse Beispiele, die das Kalziumsignal-Netzwerk der Zelle in diese Regulation involviert. Die Pyruvatdehydrogenase der Mitochondrien wird beispielsweise in ihrer Aktivität durch Calmodulininhibitoren gehemmt (Miernyk et al. 1987). Das Enzym ist an der Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA beteiligt, ein wichtiger Verbindungsschritt zwischen Glykolyse und Zitronensäurezyklus könnte demzufolge durch Calcium reguliert werden. Darüber hinaus trägt eine Untereinheit der in der Matrix lokalisierten Glutamatdehydrogenase ein EF-Hand-Motiv und soll durch Zugabe von Calcium aktiviert werden (Turano et al. 1997). Calmodulin ist vor allem an Mechanismen der Aktivierung oder Inhibition von Zielproteinen beteiligt. Die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin kann beispielsweise zur Konformationsänderung eines Proteins, sowie zur Verdrängung von autoinhibitorischen Domänen und somit zur Aktivierung von Enzymen führen (Bouche et al. 2005). Des Weiteren kann sie Einfluss auf die Bildung von Dimeren bzw. Komplexen nehmen. Die calciumabhängige Interaktion von Calmodulin mit der C-terminalen Domäne der Glutamat Decarboxylase (GAD) soll verantwortlich sein für die Dimerisierung des Enzymes und weiterhin für die Bildung eines hochmolekularen Komplexes (Yap et al. 2003). Das Öffnen und Schließen des Calcium-abhängigen SK-Kanals (small conductance Ca^{2+} -activated potassium channel) wird ebenfalls durch Calmodulin reguliert (Hoeftlich and Ikura 2002). Im geschlossenen Zustand binden hierbei zwei Calmoduline mittels des C-terminalen EF-Hand-Motives an zwei Ziel-Proteine, die als Dimer vorliegen. Über die Bindung von Kalzium-Molekülen an die N-terminalen EF-Hand-Motive des Calmodulins wird der Kanal geöffnet und somit das Dimer gelöst. Eine solche Regulation durch Calmodulin gibt Hinweise darauf, auf welche Weise die in dieser Arbeit aufgezeigten Eigenschaften von atTim23.2 möglicherweise miteinander korreliert werden könnten. Das Öffnen und Schließen der Importpore könnte durch eine Dimerisierung zweier atTim23.2-Proteine hervorgerufen werden. Zusätzlich könnte die Anbindung von Calmodulin an die in der Matrix oder im IMR identifizierten CaMBD des Proteins, wie für den SK-Kanal gezeigt wurde, eine solche Dimerisierung bzw.

Interaktion auslösen. Dadurch könnte reguliert werden, welche und in welcher Menge bestimmte Proteine in die Matrix gelangen, um dort bestimmte Prozesse zur Reaktion der pflanzlichen Zelle auf einen bestimmten Reiz zu aktivieren. Ob und inwiefern ein solcher Mechanismus besteht bzw. eine solche Regulation der Dimerisierung durch Calmodulin stattfindet, muss durch weitere experimentelle Analysen geklärt werden.

Interessanterweise konnten neuste Studien eine Interaktion zwischen Komplex I der Atmungskette und dem TIM23-Komplex in *Arabidopsis* aufzeigen (Wang et al. 2012). Die Proteine Tim23.2 und B14.7, eine Untereinheit von Komplex I, können dabei in beide Komplexe integriert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Menge von Komplex I im umgekehrten Verhältnis zur Menge von Tim23 steht. Veränderungen innerhalb der Atmungskette im Bereich von Komplex I, z.B. wegen oxidativer Schäden, könnten somit Signale auslösen, welche die Menge von Tim23.2 erhöhen und somit die Biogenese der Mitochondrien aktivieren. Eine Kalzium-abhängige Regulation von atTim23.2 *via* Calmodulin-Bindung könnte damit nicht nur den Import von Proteinen sondern ebenfalls die Energiegewinnung durch die aerobe Respiration in den Mitochondrien regulieren. Dies könnte ein neues System darstellen, was einerseits mitochondriale Funktionen und andererseits das Signalnetzwerk der Zelle miteinander verbindet.

Literaturverzeichnis

- Adams, M. D., Wagner, L. M., Graddis, T., Landick, R., Antonucci, T., Gibson, A. L., and Oxender, D. (1990). Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the liv-i and ls transport systems of escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 265(20):11436–11443.
- Arazi, T., Baum, G., Snedden, W. A., Shelp, B. J., and Fromm, H. (1995). Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiol*, 108(2):551–61. Arazi, T Baum, G Snedden, W A Shelp, B J Fromm, H Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't United states Plant physiology Plant Physiol. 1995 Jun;108(2):551-61.
- Bachs, O., Agell, N., and Carafoli, E. (1992). Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1113(2):259–270.
- Baker, K. P., Schaniel, A., Vestweber, D., and Schatz, G. (1990). A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature*, 348(6302):605–609.
- Balsera, M., Goetze, T. A., Kovács-Bogdán, E., Schürmann, P., Wagner, R., Buchanan, B. B., Soll, J., and Bölter, B. (2009). Characterization of tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to ca²⁺ and a stromal regulatory disulfide bridge. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5):2603–2616.
- Bauer, M. F., Gempel, K., Reichert, A. S., Rappold, G. A., Lichtner, P., Gerbitz, K.-D., Neupert, W., Brunner, M., and Hofmann, S. (1999). Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase. *Journal of molecular biology*, 289(1):69–82.
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., and Brunner, M. (1996). Role of tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, 87(1):33–41.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1):11–21.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. i. the mode of phage liberation by lysogenic escherichia coli. *J Bacteriol*, 62(3):293–300. Bertani, g Not Available Journal of bacteriology J Bacteriol. 1951 Sep;62(3):293-300.

- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, rna and dna in polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS*, 8(2):93–99.
- Bouche, G., N., Yellin, A., Snedden, W. A., and Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56:435–466.
- Bussemer, J., Chigri, F., and Vothknecht, U. C. (2009). Arabidopsis atpase family gene 1-like protein 1 is a calmodulin-binding aaa+-atpase with a dual localization in chloroplasts and mitochondria. *FEBS Journal*, 276(14):3870–3880.
- Cabantous, S., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2004). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 23(1):102–107.
- Carrie, C., Giraud, E., Duncan, O., Xu, L., Wang, Y., Huang, S., Clifton, R., Murcha, M., Filipovska, A., and Rackham, O. (2010). Conserved and novel functions for arabidopsis thaliana mia40 in assembly of proteins in mitochondria and peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46):36138–36148.
- Cheng, S.-H., Willmann, M. R., Chen, H.-C., and Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. the arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiology*, 129(2):469–485.
- Chew, O., Lister, R., Qbadou, S., Heazlewood, J. L., Soll, J., Schleiff, E., Millar, A. H., and Whelan, J. (2004). A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor. *FEBS letters*, 557(1):109–114.
- Chigri, F., Flosdorff, S., Pilz, S., Kölle, E., Dolze, E., Gietl, C., and Vothknecht, U. (2012). The arabidopsis calmodulin-like proteins atcm130 and atcm13 are targeted to mitochondria and peroxisomes, respectively. *Plant Molecular Biology*, 78(3):211–222.
- Chigri, F., Soll, J., and Vothknecht, U. C. (2005). Calcium regulation of chloroplast protein import. *The Plant Journal*, 42(6):821–831.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80(2):259–268.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 6(131):1047–1058.
- Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiarz, F. R., and Thorner, J. (1986). Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell*, 47(3):423–431.
- Day, I., Reddy, V., Shad Ali, G., and Reddy, A. S. N. (2002). Analysis of ef-hand-containing proteins in arabidopsis. *Genome Biology*, 3(10):1–24.

- DeFalco, T. A., Bender, K. W., and Snedden, W. A. (2010). Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem J*, 425(1):27–40. DeFalco, Thomas A Bender, Kyle W Snedden, Wayne A Review England The Biochemical journal Biochem J. 2009 Dec 14;425(1):27-40.
- Demishtein-Zohary, K., Marom, M., Neupert, W., Mokranjac, D., and Azem, A. (2015). Gxxxg motifs hold the tim23 complex together. *FEBS Journal*.
- Dolze, E., Chigri, F., Höwing, T., Hierl, G., Isono, E., Vothknecht, U., and Gietl, C. (2013). Calmodulin-like protein atml3 mediates dimerization of peroxisomal processing protease atdeg15 and contributes to normal peroxisome metabolism. *Plant Molecular Biology*, 83(6):607–624.
- Duncan, O., Murcha, M. W., and Whelan, J. (2013). Unique components of the plant mitochondrial protein import apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(2):304–313.
- Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., and Hofnung, M. (1984). Sequences of the male gene and of its product, the maltose-binding protein of escherichia coli k12. *Journal of Biological Chemistry*, 259(16):10606–10613.
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., and Sonnhammer, E. L. (2008). The pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 36(suppl 1):D281–D288.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1592(1):63–77.
- Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*, 7(3):253–263.
- Gross, D., L. E., Machettira, A. B., Rudolf, M., Schleiff, E., and Sommer, M. S. (2011). Gfp-based in vivo protein topology determination in plant protoplasts. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 21:89–97.
- Guo, H., Mockler, T., Duong, H., and Lin, C. (2001). Sub1, an arabidopsis ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science*, 291(5503):487–490.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4):557–580. Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Heins, L. and Schmitz, U. K. (1996). A receptor for protein import into potato mitochondria. *The Plant Journal*, 9(6):829–839.

- Hoeflich, K. P. and Ikura, M. (2002). Calmodulin in action: Diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, 108(6):739–742.
- James, P., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1995). Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends in Biochemical Sciences*, 20(1):38–42.
- Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U. K., and Braun, H.-P. (1998). Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27):17251–17257.
- Johnsson, N. and Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22):10340–10344.
- Kapust, R. B. and Waugh, D. S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 8(8):1668–1674. 10452611[pmid] Protein Sci.
- Katoh, K., Kuma, K.-i., Toh, H., and Miyata, T. (2005). Mafft version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33(2):511–518.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). Mafft: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14):3059–3066.
- Katzen, F., Fletcher, J. E., Yang, J.-P., Kang, D., Peterson, T. C., Cappuccio, J. A., Blanchette, C. D., Sulchek, T., Chromy, B. A., Hoeprich, P. D., Coleman, M. A., and Kudlicki, W. (2008). Insertion of membrane proteins into discoidal membranes using a cell-free protein expression approach. *Journal of Proteome Research*, 7(8):3535–3542.
- Koop, H. U., Steinmuller, K., Wagner, H., Rossler, C., Eibl, C., and Sacher, L. (1996). Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta*, 199(2):193–201. Koop, H U Steinmuller, K Wagner, H Rossler, C Eibl, C Sacher, L Research Support, Non-U.S. Gov't Germany Planta Planta. 1996;199(2):193-201.
- Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: The lead currency of plant information processing. *The Plant Cell Online*, 22(3):541–563.
- Kuhn, S., Bussemer, J., Chigri, F., and Vothknecht, U. C. (2009). Calcium depletion and calmodulin inhibition affect the import of nuclear-encoded proteins into plant mitochondria. *The Plant Journal*, 58(4):694–705.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685. 10.1038/227680a0.

- Lang, B. F., Gray, M. W., and Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual review of genetics*, 33(1):351–397.
- Lister, R., Carrie, C., Duncan, O., Ho, L. H., Howell, K. A., Murcha, M. W., and Whelan, J. (2007). Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *The Plant Cell Online*, 19(11):3739–3759.
- Lister, R., Hulett, J. M., Lithgow, T., and Whelan, J. (2005). Protein import into mitochondria: origins and functions today (review). *Molecular Membrane Biology*, 22(1-2):87–100.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., and Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin b–like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *The Plant Cell Online*, 14(suppl 1):S389–S400.
- MacKenzie, K. R., Prestegard, J. H., and Engelman, D. M. (1997). A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, 276(5309):131–133.
- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth*. Yale University Press New Haven.
- McCormack, E. and Braam, J. (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of arabidopsis. *New Phytologist*, 159(3):585–598.
- McCormack, E., Tsai, Y.-C., and Braam, J. (2005). Handling calcium signaling: Arabidopsis cams and cmls. *Trends in Plant Science*, 10(8):383–389.
- Mereschkowski, K. S. (1905). Ueber natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt*.
- Miernyk, J. A., Fang, T. K., and Randall, D. D. (1987). Calmodulin antagonists inhibit the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 262(32):15338–15340.
- Murcha, M. W., Elhafez, D., Lister, R., Tonti-Filippini, J., Baumgartner, M., Philippar, K., Carrie, C., Mokranjac, D., Soll, J., and Whelan, J. (2007). Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in arabidopsis. *Plant physiology*, 143(1):199–212.
- Murcha, M. W., Elhafez, D., Millar, A. H., and Whelan, J. (2005). The c-terminal region of tim17 links the outer and inner mitochondrial membranes in arabidopsis and is essential for protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16):16476–16483.
- Murcha, M. W., Kmiec, B., Kubiszewski-Jakubiak, S., Teixeira, P. F., Glaser, E., and Whelan, J. (2014a). Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation. *Journal of Experimental Botany*, 65(22):6301–6335.

- Murcha, M. W., Lister, R., Ho, A. Y. Y., and Whelan, J. (2003). Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(4):1737–1747.
- Murcha, M. W., Narsai, R., Devenish, J., Kubiszewski-Jakubiak, S., and Whelan, J. (2015). Mpic: A mitochondrial protein import components database for plant and non-plant species. *Plant and Cell Physiology*, 56(1):e10–e10.
- Murcha, M. W., Wang, Y., Narsai, R., and Whelan, J. (2014b). The plant mitochondrial protein import apparatus—the differences make it interesting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(4):1233–1245.
- Murcha, M. W., Wang, Y., and Whelan, J. (2012). A molecular link between mitochondrial preprotein transporters and respiratory chain complexes. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12):1594–1597. 2012PSB0335[PII] 23073015[pmid] Plant Signal Behav.
- O’Neil, K. T. and DeGrado, W. F. (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(2):59–64.
- Pareek, G., Krishnamoorthy, V., and D’Silva, P. (2013). Molecular insights revealing interaction of tim23 and channel subunits of presequence translocase. *Molecular and cellular biology*, 33(23):4641–4659.
- Perochon, A., Aldon, D., Galaud, J.-P., and Ranty, B. (2011). Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*, 93(12):2048–2053.
- Perry, A. J., Rimmer, K. A., Mertens, H. D., Waller, R. F., Mulhern, T. D., Lithgow, T., and Gooley, P. R. (2008). Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3):265–274.
- Pohlmeyer, K., Soll, J., Steinkamp, T., Hinnah, S., and Wagner, R. (1997). Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17):9504–9509.
- Poovaiah B.W., Liqun Du, H. W. and Yang, T. (2013). Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant Physiology*, 163(2):531–542.
- Pope, B. and Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 24(3):536–7. Pope, B Kent, H M England Nucleic acids research Nucleic Acids Res. 1996 Feb 1;24(3):536-7.
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., and Leister, D. (2010). Role of plastid protein phosphatase tap38 in lhci dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS biology*, 8(1):e1000288.

- Pudelski B., Kraus S., S. J. and K., P. (2010). The plant prat proteins - preprotein and amino acid transport in mitochondria and chloroplasts. *Plant Biology*, 12(s1):42–55.
- Rassow, J., Dekker, P. J., van Wilpe, S., Meijer, M., and Soll, J. (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *Journal of molecular biology*, 286(1):105–120.
- Reddy, A. S., Ali, G. S., Celesnik, H., and Day, I. S. (2011). Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell Online*, 23(6):2010–2032.
- Rhoads, A. R. and Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *The FASEB Journal*, 11(5):331–340.
- Rimmer, K. A., Foo, J. H., Ng, A., Petrie, E. J., Shilling, P. J., Perry, A. J., Mertens, H. D., Lithgow, T., Mulhern, T. D., and Gooley, P. R. (2011). Recognition of mitochondrial targeting sequences by the import receptors tom20 and tom22. *Journal of molecular biology*, 405(3):804–818.
- Sambrook, R. J. and Girling, D. J. (2001). A national survey of the chemotherapy regimens used to treat small cell lung cancer (sclc) in the united kingdom. *Br J Cancer*, 84(11):1447–52. Sambrook, R J Girling, D J Scotland British journal of cancer Br J Cancer. 2001 Jun 1;84(11):1447-52.
- Schatz, G. (1996). The protein import system of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50):31763–31766.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I., and Kunze, R. (2003). Aramemnon, a novel database for arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiology*, 131(1):16–26.
- Senes, A., Engel, D. E., and DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, gxxxg-like and proline motifs. *Current opinion in structural biology*, 14(4):465–479.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C., and Teige, M. (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of Experimental Botany*, 63(4):1525–1542.
- Stagljär, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and Te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9):5187–5192.
- Staros, J. V., Wright, R. W., and Swingle, D. M. (1986). Enhancement by n-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical biochemistry*, 156(1):220–222.

- Tianbao Yang, B. P. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in plant science*, 8(10):505–512.
- Truscott, K. N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A. J., Rassow, J., Pfanner, N., and Wagner, R. (2001). A presequence-and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by tim23. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(12):1074–1082.
- Turano, F. J., Thakkar, S. S., Fang, T., and Weisemann, J. M. (1997). Characterization and expression of nad (h)-dependent glutamate dehydrogenase genes in arabidopsis. *Plant Physiology*, 113(4):1329–1341.
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., and Whelan, J. (2009). Defining the mitochondrial stress response in arabidopsis thaliana. *Molecular Plant*, 2(6):1310–1324.
- van Heeckeren, W. J., Sellers, J. W., and Struhl, K. (1992). Role of the conserved leucines in the leucine zipper dimerization motif of yeast gcn4. *Nucleic acids research*, 20(14):3721–3724.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., and Terwilliger, T. C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 17(7):691–695.
- Wang, Y., Carrie, C., Giraud, E., Elhafez, D., Narsai, R., Duncan, O., Whelan, J., and Murcha, M. W. (2012). Dual location of the mitochondrial preprotein transporters b14. 7 and tim23-2 in complex i and the tim17: 23 complex in arabidopsis links mitochondrial activity and biogenesis. *The Plant Cell Online*, 24(6):2675–2695.
- Wang, Z., Xie, W., Chi, F., and Li, C. (2005). Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in arabidopsis. *FEBS Lett*, 579(7):1683–7. Wang, Zhe Xie, Wanqin Chi, Fang Li, Cuifeng Research Support, Non-U.S. Gov't Netherlands FEBS letters FEBS Lett. 2005 Mar 14;579(7):1683-7.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15):14473–14476.
- Yap, K. L., Yuan, T., Mal, T. K., Vogel, H. J., and Ikura, M. (2003). Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin. *Journal of molecular biology*, 328(1):193–204.
- Zhang, Y., Xu, Y., Zhao, Q., Ji, Z., Deng, H., and Li, S. J. (2012). The structural characteristics of human preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane tim23: Implications for its physiological activities. *Protein expression and purification*, 82(2):255–262.

A. Anhang

Tabelle A.1. Liste der verwendeten Primer

Bei den Klonierungsprimern ist die angehängte Schnittstelle angegeben. VL: Volllängenkonstrukt; fw: Vorwärtsprimer; rw: Rückwärtsprimer; AS: Aminosäure

Oligoname	Sequenz (5' → 3')
saGFP Tim23.2 VL ApaI fw	AGGGGCCCCATGGCGGCTAATAACAGATCC
saGFP Tim23.2 VL NotI rw	TAAGCGGCCGCCAATGGGCACATACCG
saGFP Tim23.2 VL NotI rw (STOP)	TAAGCGGCCGCCTTAAATGGGCACATACCG
saGFP Mia40 VL ApaI fw	AGGGGCCCCATGGGTCAAGCTCAAAGTGA
saGFP Mia40 VL NotI rw	TAAGCGGCCGCCAAGCTTGGAATTGCCACTGC
pMal Tim23.2 VL NdeI fw	GGGCATATGGCGGCTAATAACAGATCCGATCATGG
pMal Tim23.2 VL rw 1	GTGGCTCCAAGCGCTAATGGGCACATACC
pMal /strep EcoRI rw 2	ATAGAATTCTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAG
pMal Tim23.2 AS 1-70 NdeI fw	GGGCATATGGCGGCTAATAACAGATC
pMal Tim23.2 AS 1-70 rw 1	GGTGGCTCCAAGCGCTACCGAGGTAAGCTGTT
pMal Tim23.2 AS 80-110 NdeI fw	GGCATATGGTCATCACTGGAGTCAAAA
pMal Tim23.2 AS 80-110 rw 1	GGTGGCTCCAAGCGCTAGTTTCGACCAGTTTGAC
pMal Tim23.2 AS 120-140 NdeI fw	GCATATGGTTTACGCAGGGATCGAGA
pMal Tim23.2 AS 120-140 rw 1	GGTGGCTCCAAGCGCTGGTCCAAACATCATCTCTA
Tim23.2 VL SfiI fw	TCGGGCCATTACGGCCATGGCGGCTAATAACAG

	ATCCGATCAT
Tim23.2 VL SfiI rw	TAGGCCGAGGCGGCCATAATGGGCACATACC
Tim23.2 VL SfiI rw (STOP)	TTGGCCGAGGCGGCCTTAAATGGGCACATACC
Tim23.2 AS 62-188 SfiI fw	TCGGGCCATTACGGCCATGTTCTACACCGGAACAGCT
Tim23.2 AS 1-151 SfiI rw	TAGGCCGAGGCGGCCATAACAGCTCCGGTTC
Tim23.2 Δ AS 62-110 SfiI Overlap rev	CAATCCGATTACCCCAAGTGAGATTCTCACC
Tim23.2 Δ AS 62-110 SfiI Overlap fw	GGTGAGAATCTCACTTGGGGTAATCGGATTG
Tim23.2 Δ AS 110-152 SfiI Overlap rev	CTCGCCGCTCTTCGACCAGTTTGACCA
Tim23.2 Δ AS 110-152 SfiI Overlap fw	CAAACCTGGTCGAAGAGCGGCGAGAGGA

Danksagung

Die letzten fünf Jahre waren nicht immer einfach, doch haben sie mich für mein weiteres Leben geprägt. Die AG Vothknecht ist eine tolle Arbeitsgruppe, die mir nicht nur geholfen hat diese Arbeit zu verfassen und experimentell zu erarbeiten, sondern mir auch neue gute Freunde beschert hat. Meinen herzlichen Dank gilt vor allem Frau Professor Ute Vothknecht, die mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen, sondern auch für ständige Diskussionen bereit war und dabei immer vielen guten Ratschläge gegeben hat. Sie hat immer ein offenes Ohr und jede Menge gute Ideen für jedermann. Als Professorin und Chefin ist sie wunderbar und schafft nebenbei ein Arbeitsklima was das Arbeiten in ihrer Gruppe zu einer Freude macht.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Fatima Chigri bedanken. Sie stand mir in den letzten Jahren zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Für ihre Hilfe und Unterstützung auch schon während meines Studiums und der Diplomarbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ohne meine Arbeitskollegen und Freunde Sandra (meine „Sis“), Monika, Claudia, Steffi, Henning, Nargis, Norbert und Ariel wäre die Zeit im Labor und Gewächshaus nicht so schön gewesen. Ob Grillfeste, Ausflüge, Konferenzen, wir hatten immer viel Spaß und ich war immer sehr gern mit euch zusammen. Weiterhin danke ich euch für eure Geduld und das gute Arbeitsklima. Die Zeit werde ich niemals vergessen. Außerdem möchte ich mich bei meinen diversen Praktikanten und Bachelorstudenten bedanken, deren Betreuung und Arbeit mir ebenfalls weitergeholfen hat. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. Philippar und R.Stübe für die Unterstützung beim Umgang mit dem Split-Ubiquitin-System, sowie S.Stael für die Bereitstellung der saGFP-Vectoren.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freundinnen Jara und Steffi bedanken. Ihr habt mir immer beigestanden und mir geholfen nicht aufzugeben. Ich hoffe wir werden immer der „BS(H)W“-Komplex bleiben.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, Schwiegereltern und an den Rest der Familie. Ihr habt versucht immer da zu sein, zu helfen wo es nur ging, auch wenn wir immer viele Kilometer getrennt waren. Ohne Euch hätte das alles nicht funktioniert. Habt vielen Dank.

Zuletzt möchte ich mich mit all meiner Liebe bei meinem Mann und meinen Kindern bedanken. Stephan, seit 10 Jahren begleitest du mich nun schon auf meinem Weg und es war die beste Entscheidung meines Lebens mit dir nach München zu gehen. Du bist immer da, tröstest mich wenn es mir schlecht geht, ermutigst mich wenn ich aufgeben will. Und du bist ein wundervoller Vater. Du hast mir das schönste Geschenk gemacht was man sich nur vorstellen kann, unsere Prinzessin Lilly und unser kleiner Prinz Louis. Ohne Euch will und kann ich nicht mehr sein.

DANKE, dass es euch gibt!

Lebenslauf

Geraldine Hromatke

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname	Hromatke(geb. Schiffner), Geraldine
Geburtsdatum	23.07.1985
Geburtsort	Aschersleben (Deutschland)
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

08/2010 – 10/2015	<p>Promotion im Bereich Molekularbiologie und Zellbiologie Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München</p> <ul style="list-style-type: none"> • Thema: „Identifizierung und Charakterisierung der mitochondrialen Translokationspore Tim23.2 als Calmodulin-bindendes Protein“ • Mitglied der „Graduate School Life Science Munich (LSM)-From Molecules to Systems“ • Methoden: <ul style="list-style-type: none"> – Klonierungen, Lokalisations-/Interaktionsstudien, – Immunodekoration: Westernblot, – bioinformatische Analysen, Fluoreszenzmikroskopie.
10/2005 – 03/2010	<p>Diplom (univ.) in Biologie Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München (Abschlussnote: 1,3) Diplomarbeit: „Regulation der Translokation Pore Tim23 durch Calcium/Calmodulin“</p>
07/2005	<p>Abitur Novalis Gymnasium in Hettstedt (Abschlussnote: 2,20)</p>